

Institut für Diabetesforschung
an der Klinik und Hochschulambulanz
für Kinder- und Jugendmedizin
des Klinikums rechts der Isar der TU München
Leitung: Prof. Dr. med. Anette-G. Ziegler

**Die Inselentzündung bei der NOD Maus unter verschiedenen
immunsuppressiven Therapien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Susanne Müller
aus München
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Anette-G. Ziegler
Mitberichtersteller:	Prof. Dr. Ludger Klein Prof. Dr. Klaus G. Parhofer Prof. Dr. Berthold Koletzko
Mitbetreuung durch die Promovierten Mitarbeiter:	Dr. Sandra Hummel Dr. Kerstin Koczwara
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	15.01.2009

für meine Eltern

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	I
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	IV
1. Einleitung	1
2. Grundlagen des Typ 1 Diabetes	5
2.1. Ätiologie und Pathogenese	5
2.2. Die NOD Maus, ein Tiermodell für Typ 1 Diabetes	9
2.3. Histologie der Langerhans'schen Inseln	10
2.4. Untersuchungen zur Insulitis beim Typ 1 Diabetes	10
2.5. Zelluläre Immunmarker des Typ 1 Diabetes	11
2.6. Humorale Immunmarker des Typ 1 Diabetes	12
3. Stand der Forschung als Grundlage dieser Arbeit	15
3.1. Gluten als möglicher Auslöser der Autoimmunerkrankung Typ 1 Diabetes	15
3.2. Einfluss von Histamin, Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten, Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten auf die diabetes-assoziierte Autoimmunität bei der NOD Maus	17
3.3. Einfluss von Immunisierung mit Insulin auf die diabetes-assoziierte Autoimmunität bei der NOD Maus	19
4. Spezielle Fragestellung	21
5. Tiermaterial, Studiendesign und Methoden zur Untersuchung des Infiltrationsgrades der Langerhans'schen Inseln bei der NOD Maus unter verschiedenen immunsuppressiven Therapien	22
5.1. Untersuchte Tiere	22
5.2. Studiendesign	25
5.2.1. Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung auf die Entwicklung des autoimmunen Diabetes bei der NOD Maus	25
5.2.1.1. Beschreibung des Versuchsaufbaus	25
5.2.1.2. Beschreibung der Nahrungszusammensetzung	28
5.2.2. Einfluss eines Histamin-1-Rezeptorantagonisten auf die Entwicklung des autoimmunen Diabetes bei der NOD Maus	29
5.2.3. Einfluss einer Immunisierung mit diabetesassoziierten Antigenen auf die Entwicklung des autoimmunen Diabetes bei der NOD Maus	31
5.2.4. Behandlung und Nachverfolgung der NOD Mäuse in allen Behandlungs- und Kontrollgruppen	33

5.3.	Exitus bei Diabetesmanifestation oder am Versuchsende mit Organentnahme	33
5.4.	Anfertigung der murinen Pankreasparaffinschnitte	34
5.5.	Bestimmung des Insulitisgrades	35
5.6.	Statistik	39
6.	Ergebnisse	40
6.1.	Insulitishäufigkeit und Diabetesmanifestation in unbehandelten NOD Mäusen unterschiedlichen Geschlechts	40
6.1.1.	Insulitishäufigkeit bei unbehandelten NOD Mäusen unterschiedlichen Geschlechts	40
6.1.2.	Häufigkeit der Diabetesentwicklung in unbehandelten NOD Mäusen unterschiedlichen Geschlechts	42
6.1.3.	Kumulative Diabetesinzidenzen in Abhängigkeit zum Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln unbehandelter NOD Mäuse unterschiedlichen Geschlechts.	43
6.2.	Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung auf die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes bei der NOD Maus	45
6.2.1.	Einfluss einer bezüglich des Glutengehaltes modifizierten Nahrung auf die Diabetes-Inzidenz bei der NOD Maus	46
6.2.2.	Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung auf die Insulitishäufigkeit bei der NOD Maus	47
6.2.3.	Kumulative Diabetesinzidenzen in Abhängigkeit zum Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln der NOD Mäuse unter dem Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung.	49
6.2.4.	Einfluss einer bezüglich des Glutengehaltes modifizierten Nahrung auf die Diabetesmanifestation bei weiblichen NOD-Mäusen bis zu einem Lebensalter von 12 Wochen	51
6.2.5.	Einfluss einer bezüglich des Glutengehaltes modifizierten Nahrung auf die Insulitishäufigkeit bei der NOD Maus bei einem Lebensalter von 12 Wochen	52
6.3.	Einfluss eines Histamin 1 und 2 Rezeptorantagonisten auf die diabetes-assoziierte Autoimmunität	54
6.3.1.	Insulitishäufigkeit der oral mit Histamin 1 Rezeptor- und Histamin 2 Rezeptorantagonisten behandelten NOD Mäuse	54
6.3.2.	Diabetesinzidenz der oral mit Histamin 1 Rezeptor- und Histamin 2 Rezeptorantagonisten behandelten NOD Mäuse	56

6.3.3. Diabetesinzidenz in Relation zur Insulitis der oral mit Histamin 1 Rezeptor- und Histamin 2 Rezeptorantagonisten behandelten NOD Mäuse	57
6.4. Einfluss einer Immunisierung mit diabetesassoziierten Antigenen auf die Diabetesentwicklung und die diabetesassoziierte Autoimmunität	59
6.4.1. Diabetesinzidenz weiblicher NOD Mäuse immunisiert mit diabetes- assoziierten Antigenen	60
6.4.2. Insulitis weiblicher NOD Mäuse immunisiert mit diabetesassoziierten Antigenen	61
7. Diskussion	62
7.1. Einfluss des Geschlechts auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Diabetesmanifestation im NOD Mausmodell	62
7.2. Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell	63
7.3. Einfluss der oralen Zufuhr von Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes	67
7.4. Einfluss einer Immunintervention durch exogenes Insulin auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell	69
8. Zusammenfassung	72
Literaturverzeichnis	77
Lebenslauf	88
Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin (Impfstoff gegen Tuberkulose)
DOB	Date of birth
DT	Diphtherie-Tetanus-Toxoid
GAD	Glutamatdecarboxylase
H1 R	Histamin-1-Rezeptoren
H2 R	Histamin-2-Rezeptoren
HLA	Histokompatibilitätskomplex (human leucozyte antigen)
HR	Histaminrezeptoren
IAA	Insulinautoantikörper
IA-2(A)	(Antikörper gegen) Protein-Tyrosinphosphatase IA-2
ICA	Inselzell-Antikörper
IE	Internationale Einheiten
IFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvanz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
NHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NOD	nonobese diabetic
PNMT	Phenolethanolamin-N-Methyl-Transferase
T1D	Typ 1 Diabetes
Th1-, Th2-	T-Helfer 1-, THelfer2-
TT	Tetanustoxoid
vs	versus

1. Einleitung

Der Diabetes mellitus stellt in den heutigen Industrieländern eine der häufigsten endokrinen Erkrankungen dar. Die American Diabetes Association (1997) teilt den Diabetes mellitus nach ätiologischen Gesichtspunkten in 4 große Gruppen ein: Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes, andere Diabetesformen und Gestationsdiabetes (1). In Deutschland haben etwa 0,3 % der Bevölkerung einen Typ 1 Diabetes (74). Die Zahl der Neuerkrankungen nimmt weltweit stetig zu, so dass man davon ausgeht, dass die Anzahl der an Typ 1 Diabetes Neuerkrankten im Jahre 2010 um 40 % höher liegen wird als vor 10 Jahren (3). Insgesamt ist die Inzidenz in den nördlichen Staaten (Finnland 40 pro 100 000 pro Jahr) höher als in den mediterranen Staaten mit Ausnahme von Sardinien. Am häufigsten sind Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene im Alter zwischen 14 und 20 Jahren betroffen (75). Trotz optimaler Stoffwechseleinstellung lassen sich die diabetischen Spätfolgen wie kardiovaskuläre Erkrankungen, terminale Niereninsuffizienz, Blindheit und Amputationen oft nicht vermeiden. Dies führt zu erheblichen Einschränkungen in der Lebensqualität und Lebenserwartung der Langzeitpatienten. Zudem stellt die Erkrankung eine Belastung für das Gesundheitssystem in Milliardenhöhe dar. Dies begründet die Notwendigkeit der medizinischen Forschung Interventionstherapien zu entwickeln, die die Entstehung der Inselzellautoimmunität und damit den Ausbruch der Erkrankung verhindern.

Die Erkrankung Typ 1 Diabetes entsteht durch eine chronisch progrediente Entzündung der pankreatischen Langerhans'schen Inseln, die sogenannte Insulitis, in deren Folge die insulinproduzierenden beta-Zellen (β -Zellen) selektiv zerstört werden (75). Dieser Prozess verläuft über viele Jahre symptomlos. Erst wenn der überwiegende Teil der β -Zellen zerstört ist, und aufgrund des Insulinmangels die Glukosehomöostase nicht mehr aufrechterhalten werden kann, kommt es zum klinischen Bild des Typ 1 Diabetes.

Der Begriff Insulitis wurde bereits 1940 von von Meyenberg geprägt. Untersuchungen von humanem Pankreasgewebe haben gezeigt, dass mit zunehmender Dauer der Insulitis sowohl die, aus mononukleären Zellen bestehenden Infiltrate der Langerhans'schen Inseln, als auch die β -Zellmasse abnehmen (19,34,40). So vermutet man, dass die β -Zell-Destruktion durch den Insulitisprozess verursacht wird.

Welche Faktoren den β -Zell-Autoimmunprozess verursachen, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Auf der Basis einer genetischen Prädisposition scheinen exogene Faktoren eine wesentliche Rolle bei der Krankheitsentwicklung zu spielen, da bei eineiigen Zwillingen eine gemittelte Konkordanzrate von nur 40% vorliegt (10,83). Der Autoimmunprozess beim Typ 1 Diabetes beginnt meist schon sehr früh im Leben. Folglich wird vermutet, dass für den Defekt des Immunsystems und die Krankheitsentstehung Umweltfaktoren verantwortlich sind, die in den ersten beiden Lebensjahren einwirken. Deswegen werden vor allem auch frühkindliche Ernährungsfaktoren diskutiert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung glutenhaltiger Nahrung im Säuglingsalter unter 3 Monaten das Risiko der Kinder für das Auftreten von Insulinautoantikörpern (IAA) erhöht, insbesondere wenn die Kinder den Hochrisikogenotyp HLA DR3/ DR4-DQ8 tragen (81,122). Gluten wurde bereits vor längerer Zeit als der auslösende Faktor bei der Autoimmunerkrankung Zöliakie eindeutig identifiziert. Das häufig gemeinsame Auftreten beider Erkrankungen, sowie weitere Parallelen im Genom und der Autoimmunität legen die Vermutung nahe, dass der Nahrungsbestandteil Gluten ebenfalls Auslöser oder Trigger des Autoimmunprozesses beim Typ 1 Diabetes sein könnte. Diese Annahme konnte durch die Ergebnisse von Fütterungsversuchen im Tiermodell der NOD Maus bestätigt werden. Durch eine glutenfreie Ernährung der NOD Tiere konnte die Diabetesinzidenz im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant verringert werden (37,97). Diese Befunde lassen sowohl im Tiermodell der NOD Maus als auch beim Menschen einen präventiven Effekt einer glutenfreien Nahrung im Hinblick auf die Entstehung des Autoimmundiabetes schlussfolgern.

Die eigentliche Zerstörung der β -Zellen erfolgt durch aktivierte T-Zellen. Hinsichtlich des Zytokinprofils der beteiligten T-Helfer Zellen werden zwei antagonistische Immunreaktionstypen unterschieden und als Th1- bzw. Th2- Immunreaktion bezeichnet (78). Th1- und Th2-Zellen sind wichtige Gegenspieler in der Immunregulation und können einander über die Ausschüttung von Zytokinen beeinflussen. Wird bei Th1- mediierten Erkrankungen die Th2-Immunität gefördert, kann somit eine weniger aggressive Krankheitsphase erreicht werden. Umgekehrt werden Th2-medierte Erkrankungen durch die Stärkung der Th1-Zellen in eine klinische Remission gebracht. Der Autoimmunprozess beim Typ 1 Diabetes wird durch Th1-Zellen ausgelöst (56). Jedoch führt nicht jede Entzündung der Langerhans'schen Inseln zu einer Zerstörung der insulinproduzierenden Zellen.

Dominieren Th2- Zellen das Infiltrat, befindet sich die Erkrankung in einer latenten nicht destruktiven Phase. Werden hingegen Th1- Zellen aktiviert, kommt es zur Destruktion der β -Zellen und einer Progression der Erkrankung. Dies würde erklären, warum es Patienten gibt, die ihr Leben lang spezifische Autoantikörper aufweisen, jedoch nie an Typ 1 Diabetes erkranken, da sie möglicherweise im Stadium der benignen nicht destruktiven Insulitis verbleiben (74). Wesentlich für den Verlauf der Erkrankung sind somit endogene oder exogene Faktoren, die eine Th1- bzw. Th2-Immunität fördern können. Neue Therapieansätze zielen darauf ab, durch eine Verschiebung der destruktiven Th1- hin zu einer protektiven Th2-Immunantwort den Insulitisprozess zu inhibieren und damit Typ 1 Diabetes zu verhindern.

Histamin, ein biogenes Amin, ist in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse involviert. So ist es auch an der Regulation von Immunantworten, die während allergischen und entzündlichen Reaktionen ablaufen, beteiligt (9,11,69,96,113). Die verschiedenen Effekte von Histamin werden über unterschiedliche Histaminrezeptoren vermittelt (39,70,80). Eine Studie in einem Mausmodell mit zerstörten Histamin-1-Rezeptoren (H1R) zeigte, dass bei diesen Tieren die Sekretion des Th1-spezifischen Zytokins IFN- γ nach Stimulation mit Histamin vermindert und die Sekretion der Th2 assoziierten Zytokine IL-3 und IL-4 verstärkt war. Dagegen waren bei Mäusen mit zerstörten Histamin-2-Rezeptoren (H2R) beide Th1- und Th2-typische Zytokine verstärkt (55). Dies lässt hoffen, dass durch die Verabreichung eines Histamin-1-Rezeptorantagonisten Einfluss auf das Immunsystem genommen werden kann und durch eine erfolgreiche Verschiebung von einer Th1- gewichteten hin zu einer Th2- dominanten Immunantwort die β -Zell-Autoimmunität verhindert werden kann.

Zahlreiche Studien wurden bereits durchgeführt, bei denen Insulin oder Peptidfragmente des Insulins am Tiermodell der NOD Maus verabreicht wurden. Hierdurch konnte eine signifikante Verringerung der Diabetes-Inzidenz erreicht werden. Ebenfalls konnte unter dieser Therapie eine Reduktion der Insulitis im NOD Mausmodell erreicht werden. (54). Verschiedene Untersuchungen auf T-Zellebene belegen, dass dieser protektive Effekt des Insulins auf die Diabetesentwicklung tatsächlich mit einer Verschiebung des Immunsystems weg von einer Th1- hin zu einer protektiven Th2-Immunantwort einhergeht (6,59,120).

Die NOD Maus, das klassische Tiermodell für Typ 1 Diabetes, stellt ein exzellentes Modell dar, verschiedene Therapieansätze zu prüfen, bevor die Ergebnisse am Menschen getestet werden. Die spontane Diabetesentwicklung der NOD Maus ist der beim Menschen ähnlich und auch eine Insulitis konnte nachgewiesen werden (72). Die Zerstörung der pankreatischen Inseln entsteht kurz nach der Geburt und es werden, wie auch beim humanen Typ 1 Diabetes, als Ausdruck eines Autoimmungeschehens, diabetesassoziierte Antikörper gefunden (5,92,124).

In der vorliegenden Arbeit soll im Tiermodell der NOD Maus untersucht werden, ob es durch folgende Therapieansätze möglich ist, die Insulitis zu inhibieren und folglich Autoimmundiabetes zu verhindern.

Im ersten Studienteil wurden NOD Mäuse mit einer im Glutengehalt modifizierten Versuchsnahrung ernährt. Durch die glutenfreie Ernährung soll ein protektiver Effekt auf die β -Zell Autoimmunität erzielt werden.

In der zweiten Therapiestudie wurden NOD Mäuse oral mit einem Histamin-1-Rezeptorblocker behandelt.

In einem letzten Therapieansatz soll geprüft werden, ob sich eine Immunisierung weiblicher NOD Mäuse mit Insulin im Vergleich zu anderen diabetesassoziierten Antigenen nicht nur auf die Diabetesentwicklung, sondern auch auf die Insulitisentwicklung positiv auswirkt.

Insgesamt soll die vorliegende Arbeit im Tiermodell der NOD Maus neue innovative Therapien zur Prävention des autoimmunen Diabetes erforschen. Darüber hinaus soll die Arbeit als Vorarbeit angesehen werden, um später diese Erkenntnisse auch am Menschen zu prüfen.

2. Grundlagen des Typ 1 Diabetes

2.1. Ätiologie und Pathogenese

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine chronisch progrediente Autoimmunerkrankung mit multifaktorieller Genese, wobei die auslösenden Faktoren weitestgehend unklar sind (30). Die Bereitschaft, Typ 1 Diabetes zu entwickeln ist erblich. Die Typ 1 Diabetes Prävalenz in Deutschland beträgt etwa 0,3 %. Verwandte ersten Grades von Typ 1 Diabetikern haben ein 10 fach höheres Erkrankungsrisiko gegenüber der Normalbevölkerung (123). Das Erkrankungsrisiko für Geschwister hängt von dem Ausmaß der HLA-Identität (Human Leukocyte Antigen) ab: HLA-identische Geschwister haben ein 15 -20%iges Erkrankungsrisiko, während HLA-verschiedene Geschwister kaum ein erhöhtes Risiko haben, an einem Typ 1 Diabetes zu erkranken (30). Die Suszeptibilität für Typ 1 Diabetes ist polygen. Bislang wurden mindestens 18 verschiedene mit Typ 1 Diabetes assoziierte Genorte identifiziert (28). Der Genort, der am stärksten mit Typ 1 Diabetes assoziiert ist, ist das den HLA-Komplex codierende Gen IDDM1 auf Chromosom 6p. Daneben gibt es noch weitere Genorte, wie der IDDM2 Locus und der IDDM3 Locus auf Chromosom 15q26.

Von großer Bedeutung für Typ 1 Diabetes sind vor allem die HLA-Klasse II Merkmale der DR-DQ-Subregion. In 90% bis 95% der Fälle wurden bei Typ 1 Diabetikern HLA-DR3 und / oder- DR4 gefunden. In der Normalbevölkerung wurden diese HLA-Antigene in weniger als 40% der Fälle nachgewiesen (108). Molekulargenetische Untersuchungen haben ergeben, dass DR-Allele mit bestimmten DQ-Allelen assoziiert sind. So weisen 95% der Typ 1 Diabetiker mit dem Allel DR4 auch die DQ-Allele DQB1*0302 auf (123). Bestimmte Genotypen gehen mit einem sehr hohen Erkrankungsrisiko einher (z.B. DRB1*0302-DQA1*0301/DRB1*0201-DQA1*0501), andere Haplotypen zeigen dagegen nur eine geringe Assoziation mit Typ 1 Diabetes oder wirken gar protektiv (DRB1*0602-DQA1*0102) (82).

Die Konkordanzrate für eineiige Zwillinge liegt beim Typ 1 Diabetes bei 30 bis 50% (83). Dies deutet darauf hin, dass die genetische Prädisposition allein nicht ausreicht, um Typ 1 Diabetes zu entwickeln und für die Initiierung des autoimmunen Prozesses, der zur β -Zellzerstörung führt, exogene Einflüsse eine entscheidende Rolle spielen müssen. Es wird vermutet, dass Umweltfaktoren schon früh im Leben wirksam sein müssen, wenn sie Auslöser und nicht Modulatoren der Inselentzündung sein sollen,

da bei Personen, die später im Leben an Typ 1 Diabetes erkranken, bereits in den ersten beiden Lebensjahren Insel-Autoantikörper im Blut detektierbar sind (121). Eine Reihe von Umweltfaktoren wurden als mögliche Trigger des Autoimmunprozesses diskutiert: Stillgewohnheiten, frühe Exposition gegenüber Kuhmilch und glutenhaltiger Nahrung, Infektionen und Impfungen (35). Während einige Studien einen Zusammenhang sowohl für die Länge und Häufigkeit des Stillens bzw. der Gabe von Kuhmilchproteinen als auch für bestimmte Impfungen (Mumps, Masern, Röteln, BCG) mit der Diabetesmanifestation beschrieben haben (18,26,32,51,90), zeigten die Ergebnisse dreier prospektiver Studien keinen Zusammenhang der Umweltfaktoren Impfungen, Stillhäufigkeit und Stilldauer mit der Entstehung von β -Zell-Autoimmunität (24,42,50,81). Auch virale Einflüsse, vor allem das Coxsackie-Virus, werden mit der Diabetespathogenese in Verbindung gebracht. Es wird vermutet, dass Ähnlichkeiten zwischen Virusproteinbestandteilen und Oberflächenstrukturen auf der β -Zelle die autoimmune Reaktion gegen die β -Zelle in Gang setzen könnte. Tatsächlich bestehen Homologien zwischen dem Coxsackie B4 Virus und dem von den β -Zellen exprimierten GAD-Antigen (57). Bislang konnte jedoch keiner der genannten Faktoren eindeutig mit der Diabetespathogenese in Zusammenhang gebracht werden. Neue Publikationen berichten von einer Assoziation zwischen Glutenexposition und Diabetes. So konnte durch eine glutenfreie Nahrung die Diabetes-Inzidenz im NOD Maus Modell signifikant verringert werden. Ebenfalls konnte eine Reduzierung der Insulinautoantikörpertiter und des Infiltrationsgrades der Inseln bei den glutenfrei ernährten Tieren beobachtet werden (97). Kinder mit einem Diabetes-Hochrisikogenotyp hatten ein fünffach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von diabetesassoziierter Autoimmunität, wenn sie bereits im frühen Säuglingsalter mit glutenhaltiger Nahrung ernährt wurden (81,122).

Pathoanatomisch liegt dem Typ 1 Diabetes eine Zerstörung der pankreatischen insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans'schen Inseln zugrunde. Die pankreatischen Inseln eines neu entdeckten Typ 1 Diabetikers zeigen eine chronische Entzündung und eine Infiltration mit mononukleären Zellen und inflammatorischen Zellen. Dieser Zustand wird Insulitis genannt (40). Vor allem T-Zellen und Makrophagen (43), weniger B-Zellen und natürliche Killerzellen bilden das Infiltrat (7). Bis zur klinischen Manifestation des Typ 1 Diabetes können Monate bis Jahre vergehen, da geringe Mengen an Insulin zur Aufrechterhaltung der

Glukosehomöostase ausreichen. In dieser prädiabetischen Phase sind die β -Zellen noch in der Lage, ihre metabolische Funktion zu erfüllen. Es lassen sich aber bereits Autoantikörper gegen verschiedene diabetesassoziierte Antigene (Insulin, Glutamatdecarboxylase, Thyrosinphosphatase IA-2) im Serum der Patienten messen, die auf das Vorhandensein einer Insulitis hindeuten. In dieser Phase kommt es zu einer stetigen Abnahme der β -Zell-Masse. Aber erst wenn 80 bis 90% der insulinproduzierenden β -Zellen zerstört sind, kommt es zu einer gestörten Glukosetoleranz im oralen Glukosetoleranztest und schließlich zur klinischen Manifestation des Typ 1 Diabetes. (Abb. 1).

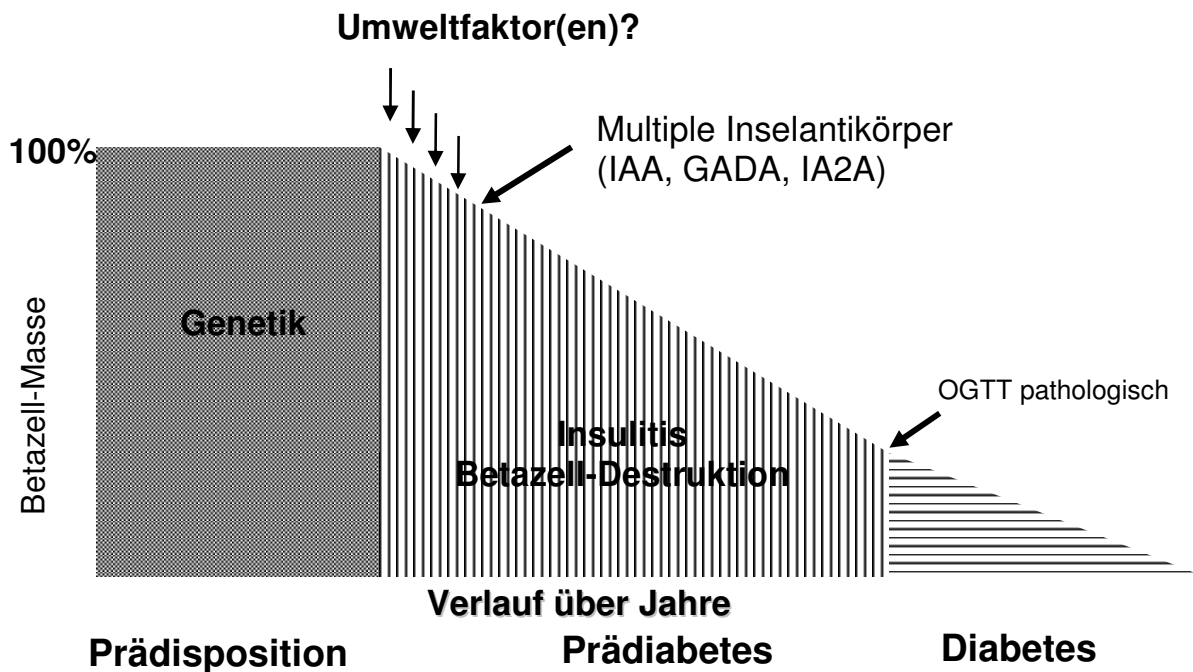


Abb. 1: Dargestellt ist ein hypothetisches Modell zur Diabetesentstehung. Auf der y-Achse ist die Masse der β -Zellen und auf der x-Achse der zeitliche Verlauf der Diabetesentwicklung dargestellt. Für die Diabetesentwicklung ist eine genetische Prädisposition Voraussetzung. Durch einwirkende exogene Faktoren (hier als Umweltfaktoren dargestellt) wird der autoimmune Prozess der β -Zellzerstörung verursacht. Diese Phase wird als Prädiabetes bezeichnet. Bereits ab Beginn der β -Zellzerstörung können Inselzellantikörper wie IAA (Insulin-Autoantikörper), IA-2A (Antikörper gegen IA-2) und GADA (Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase) im Serum gemessen werden. Sind nur noch etwa 10% der β -Zellen intakt, reicht die Insulinmenge nicht mehr aus, um die Glukosehämöostase aufrechtzuerhalten, und Typ 1 Diabetes wird manifest. Beweis dafür ist ein pathologisch ausfallender oraler Glukosetoleranztest (OGTT).

2.2. Die NOD Maus, ein Tiermodell für Typ 1 Diabetes

Die „non obese diabetic“ (NOD) Maus ist ein Tiermodell des Typ 1 Diabetes, bei dem sich spontan Insulinmangel entwickelt. Dieses Modell entstand in den 70er Jahren in Japan und geht zurück auf einen Stamm, bei dem alle Tiere Katarakt entwickelten. Eine weibliche Maus dieses Stammes zeigte spontan klinische Symptome eines autoimmunen Diabetes. Ihre Nachkommen wurden per Inzucht weiter vermehrt und nach Diabetes und Fruchtbarkeit selektiert. 1974 entwickelte dann das erste Tier spontan Diabetes. Aus dem Nachwuchs dieser Maus wurde der als NOD bezeichnete Stamm weiter gezüchtet und als Modell für den humanen Typ 1 Diabetes weltweit verbreitet (66,72).

Die spontane Diabetesentwicklung bei der NOD Maus ist der dem Menschen ähnlich. So sind auch bei den NOD Mäusen noch vor Diabetesmanifestation Insulinautoantikörper detektierbar und auch eine für den humanen Typ 1 Diabetes typische Inselentzündung ist nachweisbar (2,72,119). Im Vergleich zum humanen Typ 1 Diabetes ist Insulin bisher das einzig bekannte Inselantigen für diabetesassoziierte Antikörper bei der NOD Maus (119). Zudem haben internationale Workshops zur Bestimmung von Autoantikörpern im NOD Mausmodell gezeigt, dass die murinen Autoantikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD) und Thyrosinphosphatase IA-2 im Vergleich zum humanen Typ 1 Diabetes nur sehr unspezifisch nachzuweisen sind (15). Darüber hinaus konnte kürzlich bewiesen werden, dass GAD kein spezifisches Autoantigen für den Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell darstellt (52). Eine Infiltration von mononukleären Leukozyten in die Langerhans'schen Inseln des Pankreas ist bei allen NOD Mäusen ab der 4. bis 6. Lebenswoche zu beobachten. Die Diabetesentwicklung hingegen ist stark geschlechtsspezifisch (60). Die kumulative Diabetesinzidenz bis zur 30. Lebenswoche beträgt 80% bei den weiblichen, dagegen nur 10% bei den männlichen Tieren.

Durch eine zum humanen Typ 1 Diabetes ähnlich verlaufende Pathogenese stellen NOD Mäuse ein exzellentes Tiermodell für Studien des Immungeschehens beim Autoimmundiabetes dar und werden für Untersuchungen zur Pathogenese, Therapie und Prävention der Erkrankung genutzt.

2.3. Histologie der Langerhans'schen Inseln

Den endokrinen Anteil des Pankreas bilden die Inseln, Inselorgan bzw. Langerhans'sche Inseln genannt. Sie sind vor allem im Pankreaskörper und Pankreasschwanz angesiedelt, weniger im Pankreaskopf. Die Inseln sind im exokrinen Pankreasgewebe, meist in der Nähe von Blutgefäßen verteilt und können bereits mikroskopisch in der Übersicht als helle Flecken im dunklen Drüsengewebe erkannt werden. Jede Insel misst etwa 100 bis 500µm und besteht aus netzartig verbundenen Epithelzellsträngen, welche von Kapillaren und Bindegewebe durchsetzt sind. Beta-Zellen bilden mit 50 bis 80% den Hauptanteil der endokrinen Drüsenzellen. Neben den insulinproduzierenden β -Zellen gibt es noch weitere Inselzelltypen, welche aber bei der Diabetesentstehung nicht angegriffen werden (4). Hier sind beispielsweise die glucagonsynthetisierenden A-Zellen, die somatostatinproduzierenden D-Zellen und die PP-Zellen, welche das pankreatische Polypeptid produzieren, zu nennen. (62,67,68).

2.4. Untersuchungen zur Insulitis beim Typ 1 Diabetes

Das histopathologische Bild des Pankreas eines Typ 1 Diabetikers zeigt typischerweise mononukleäre Infiltrate in den Langerhans'schen Inseln, genannt Insulitis. Bei längerer Krankheitsdauer fällt ein nahezu vollständiges Fehlen der insulinproduzierenden β -Zellen auf, wohingegen die übrigen hormonsezernierenden Zellen erhalten bleiben. Da die β -Zellen den Hauptteil der endokrinen Drüsenzellen ausmachen, erscheinen die Inseln eines Langzeit-Typ 1 Diabetikers abnormal klein (4).

Im Rahmen von Obduktionen wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von einer lymphozytären Infiltration der pankreatischen Langerhans Inseln berichtet. Diesem Befund wurde aber wenig Aufmerksamkeit geschenkt, vielmehr sah man die Insulitis als ein transientes nicht immer vorkommendes Geschehen an, welches zudem nur bei Patienten mit einem frühen Ausbruch des Typ 1 Diabetes vorkam.

Erst 1958 durch Lecompte wurde dem Vorkommen der Insulitis im Zusammenhang mit Typ 1 Diabetes wieder mehr Beachtung geschenkt. 1965 untersuchte Gepts Pankreasgewebe von Typ 1 Diabetikern, die kurz nach Diagnosestellung verstorben waren. Es fanden sich peri- und intransuläre inflammatorische Infiltrate sowie eine Reduktion der Beta-Zellen. Er konnte beobachten, dass bei Patienten mit längerer Krankheitsdauer die Infiltrate nicht mehr und kaum noch β -Zellen nachweisbar waren (40). Diese Beobachtung konnte Foulis, der 1986 ebenfalls Pankreasgewebe von

Typ 1 Diabetikern untersuchte, bestätigen. Diese Befunde ließen vermuten dass die β -Zell Destruktion von dem Insulitisprozess verursacht wird (34). Untersuchungen von humanem Pankreasgewebe haben gezeigt, dass das inflammatorische Infiltrat überwiegend aus CD8+ T-Zellen besteht, aber auch CD4+ T-Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen wurden gefunden (4,19).

Auch im NOD Maus Modell wird eine Insulitis beobachtet. Im Alter von 4 bis 6 Wochen infiltrieren mononukleäre Zellen die Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Im Vergleich zum Menschen besteht das inflammatorische Infiltrat bei der NOD Maus überwiegend aus CD4+-T-Lymphozyten und in geringerer Zahl aus CD8+-Zellen, B-Lymphozyten und Macrophagen (84). Die Inseln des Pankreas sind vor allem in den perivaskulären und periduktalen Bereichen angeordnet, so dass sich zu Beginn des Autoimmunprozesses die Leukozyten am Rand der Inseln ansammeln. Dies wird als Periinsulitis bezeichnet. Die Leukozytenansammlung beginnt meistens an einem Inselpol, kann aber auch den gesamten Umfang der Insel umgeben. Da aber die β -Zellen mehr im Zentrum der Langerhans'schen Inseln liegen, sind sie in diesem Stadium noch weitgehend ungeschädigt. Erst ab einem Alter von 5-7 Wochen kommt es bei den weiblichen Tieren zur fortschreitenden Infiltration der Inseln und daraus resultierenden Zerstörung der β -Zellen. Es wurde beobachtet, dass dieser Prozess bei den männlichen Tieren einige Wochen später auftritt (58).

2.5. Zelluläre Immunmarker des Typ 1 Diabetes

Im NOD Maus Modell konnte beobachtet werden, dass es im Verlauf der Insulitis zum Einwandern von autoreaktiven Zellen in die pankreatischen Inseln kommt. Dieses Infiltrat besteht aus mononukleären Leukozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten. Die dominierende Zellart bilden jedoch die T-Zellen. Bei einer Inselentzündung findet man hauptsächlich CD4 und CD8 positive T-Zellen. Eine Insulitis führt nicht zwangsläufig zur Destruktion der insulinproduzierenden β -Zellen. Es wird zwischen einer benignen und einer destruktiven Insulitis unterschieden. Ausschlaggebend hierfür sind die im Infiltrat vorherrschenden T-Zell Populationen. Den CD4 positiven T-Zellen wird der maßgebliche Effekt am Zerstörungsprozess der β -Zellen zugeschrieben (45,84,109).

Mosman et al wies 1986 erstmals 2 Subtypen von CD4-Zellen in NOD Mäusen nach. Die beiden Subtypen der CD4-Zellen wurden nach ihrem unterschiedlichen

Zytokinmuster in Th (T-Helfer) 1- und Th 2-Zellen eingeteilt (77). Th1-Zellen schütten Interferon γ (INF- γ), Interleukin-2 (IL-2), IL-12 und Tumor-Nekrosefaktor- β (TNF- β) aus und sind an einer zellvermittelten proinflammatorischen Immunreaktion beteiligt. Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und werden einer allergischen IgE vermittelten Immunantwort mit starker Antikörperproduktion zugeordnet (78). Th1- und Th2-Zellen sind wichtige Gegenspieler in der Immunregulation und können einander über ihre Zytokinausschüttungen beeinflussen.

Verschiedene Studienergebnisse aus dem Tiermodell deuten darauf hin, dass beim Typ 1 Diabetes Th1-Zellen dominieren und die Entstehung der Krankheit auslösen oder verstärken. Dagegen wird den Th2-Zellen ein protektiver Effekt bei der Krankheitsentstehung zugeschrieben (110). Dominieren also Th2-Zellen und ihr Sekretionsprodukt Interleukin 4 das Infiltrat, befindet sich die Erkrankung in einer latenten, nicht destruktiven Phase, welche als benigne Insulitis bezeichnet wird. Werden hingegen Th1- Zellen mit ihrem Sekretionsprodukt IFN- γ aktiviert, kommt es zur Destruktion der β -Zellen (62).

2.6. Humorale Immunmarker des Typ 1 Diabetes

Neben der pathogenetisch bedeutsamen Aktivierung von T-Zell-Reaktionen kommt es auch zur Produktion von Autoantikörpern, die bei den betroffenen Personen bereits Jahre vor der klinischen Manifestation im Serum mittels sensitiven und international standardisierten Testmethoden gemessen werden können (13). Obwohl die Autoantikörper möglicherweise kaum zur β -Zell Destruktion beitragen, ergeben sich wichtige diagnostische Möglichkeiten im Hinblick auf Differentialdiagnose und Prädiktion des Typ 1 Diabetes. Diese Inselautoantikörper sind sehr spezifisch für Typ 1 Diabetes (3). Folgende Autoantikörper können während der prädiabetischen Krankheitsphase als Marker genutzt werden: Insulin-Autoantikörper (IAA), Inselzellantikörper (ICA), Glutamatdekarboxylase-Antikörper (GADA) und Antikörper gegen die Protein – Thyrosinphosphatasen IA-2 und IA-2 β . Aufgrund der hohen prädiktiven Aussagekraft der IAA, GADA, und IA-2A sind diese Autoantikörper am engsten mit der Entwicklung von Typ 1 Diabetes assoziiert. Titer und Anzahl korrelieren mit dem Risiko, Typ 1 Diabetes zu entwickeln, und machen sie dadurch zu einem wichtigen Instrument für die Prädiktion und Differentialdiagnostik (12,63,71,116).

ICA wurden bereits 1974 von Doniach und Bottazzo entdeckt (20). Sie sind gegen verschiedene Antigene aus dem Zytoplasma endokriner Zellen in den pankreatischen Inseln gerichtet, unter anderem gegen GAD und IA-2. Die Bestimmung der ICA erfolgt mittels indirekter Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten des humanen Pankreas. Der ICA-Test hat als Einzeltest die höchste Sensitivität und Spezifität bezüglich Diagnostik und Prädiktion eines sich entwickelnden Typ 1 Diabetes. Die Titerhöhe von ICA beeinflusst entscheidend die Höhe des Diabetesrisikos. So reflektieren hochtitrige ICA (>80 JDF-U) ein vielfach höheres Risiko als niedrig titrige ICA (< 20 JDF-U) (16,21,93). Die Praktikabilität bei großen Fallzahlen ist allerdings durch die mangelnde Verfügbarkeit und schwankende Qualität der humanen Pankreasgewebeproben begrenzt.

Insulin ist das bisher einzige β -Zell spezifische humorale Antigen im Typ 1 Diabetes. Bereits 1983 wurden Insulinautoantikörper (IAA), die gegen körpereigenes Insulin gerichtet sind, bei unbehandelten Typ 1 Diabetikern entdeckt (85). IAA spielen in der Diagnostik und Prädiktion des Typ 1 Diabetes eine wichtige Rolle, da sie bei Kindern oftmals die ersten detektierbaren Antikörper sind und der Entwicklung weiterer Antikörper vorausgehen. Das Auftreten der IAA ist mit dem Lebensalter invers assoziiert. IAA werden bei 20 bis 70% aller neu diagnostizierten Typ 1 Diabetiker gefunden; bei Kindern unter fünf Jahren sogar in 90 bis 100% der Fälle (124). Bei einem gemeinsamen Auftreten von IAA mit Inselzellantikörpern (ICA) oder Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GADA) liegt das Risiko, innerhalb der nächsten 5 Jahre an Typ 1 Diabetes zu erkranken, bei 60 bis 80% (94). Mittlerweile können IAA mittels eines neu entwickelten Mikroassay in geringen Serummengen (20 μ l) mit hoher Sensitivität und Spezifität gemessen werden.

Antikörper gegen ein 64-kDa-Inselzellprotein wurden erstmals 1982 von Baekkeskov et al. bei Patienten mit Typ 1 Diabetes beschrieben. 1990 wurde dann das 64-kDa-Protein als das γ -Amino-Buttersäure (GABA) synthetisierende Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) identifiziert (8). Es wird mit hoher Aktivität in den β -Zellen des Pankreas und in bestimmten Zellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen. Es existieren 2 GAD-Isoformen, die jeweils von unterschiedlichen Genen kodiert werden: GAD 65 und GAD 67. Für den Typ 1 Diabetes sind aber nur die GAD 65 Antikörper entscheidend. Zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation

sind GAD Antikörper bei Typ 1 Diabetikern in 80 bis 90% der Fälle nachweisbar (102). GADA werden aber auch bei neurologischen Erkrankungen, wie dem Stiffman- und dem polyendokrinen Syndrom in hoher Frequenz gefunden (103,107). Im Vergleich zu anderen Diabetes-assoziierten Antikörpern sind GADA sehr sensitive aber weniger spezifische Marker für Typ 1 Diabetes und müssen in Screening-Tests daher zur Verbesserung der Spezifität mit anderen Markern kombiniert werden.

Zwei weitere Marker zur Diagnostik und Prävention des Typ 1 Diabetes sind die Tyrosinphosphatase Antikörper IA-2 und IA-2 β A. Sie gehören zur Familie der Protein-Tyrosinphosphatasen und sind als transmembrane Proteine in der Membran von sekretorischen Vesikeln lokalisiert (65,91). IA-2 β wird vorwiegend in den β -Zellen des Pankreas exprimiert, während IA-2 in allen endokrinen Zellen und im Nervengewebe gefunden wird (106,117). Etwa 60% aller neu entdeckten Typ 1 Diabetiker sind IA-2A positiv. Antikörper gegen IA-2 sind spezifischer als GADA, da sie praktisch nie bei anderen Erkrankungen vorkommen (76). IA-2A sind von besonderer Bedeutung, da sie vor allem mit einer raschen Diabetesentwicklung verbunden sind. Personen, die neben ICA oder IAA auch IA-2A aufweisen, entwickeln sehr viel schneller Diabetes als IA-2A-negative Personen (22).

Von diesen beim humanen Typ 1 Diabetes gefundenen Antikörpern sind im Tiermodell der NOD Maus lediglich die IAA für die Prädiktion des Autoimmundiabetes aussagekräftig. Untersuchungen haben gezeigt, dass die IAA-Verläufe bei der NOD Maus mit den IAA-Verläufen prädiabetischer Kinder vergleichbar sind. So waren die murinen IAA häufig schon im Alter von 8 bis 16 Wochen detektierbar und zeigten eine starke Assoziation mit einer späteren Diabetesentwicklung (119). Im Vergleich dazu konnte die Bestimmung der beim humanen Typ 1 Diabetes identifizierten Autoantikörper gegen GAD und IA-2 bei der NOD Maus als unspezifisch eingestuft werden (15). Darüber hinaus konnte kürzlich bewiesen werden, dass GAD kein spezifisches Autoantigen für den Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell darstellt (52).

3. Stand der Forschung als Grundlage dieser Arbeit

3.1 Gluten als möglicher Auslöser der Autoimmunerkrankung Typ 1 Diabetes

Das im Getreide enthaltene Klebereiweiß Gluten ist als Auslöser der Autoimmunerkrankung Zöliakie eindeutig identifiziert worden. Seit einigen Jahren wird Gluten auch für andere Autoimmunerkrankungen, so auch für Typ 1 Diabetes als möglicher Auslöser oder Trigger des Autoimmunprozesses diskutiert (17,89). Diese Vermutung wird durch das häufig gemeinsame Auftreten beider Erkrankungen sowie durch Parallelen im Genom und der Autoimmunität bestärkt. Ebenso wurden bei beiden Erkrankungen zelluläre und humorale Störungen des Immunsystems beobachtet und als gemeinsame Pathomechanismen diskutiert (3,49,99). Sowohl bei der Zöliakie als auch beim Typ 1 Diabetes wird auf T-Zellebene ein gestörtes Gleichgewicht einhergehend mit einer dominierenden Th1-Immunantwort mit der Autoimmunität in Zusammenhang gebracht (33,46,99,101). Auffällig ist zudem, dass beide Erkrankungen sehr früh im Kindes- und Jugendalter auftreten. So vermutet man, dass Faktoren, die sehr früh im Leben auf den Organismus einwirken, das Immunsystem schädigen. Diese Vermutung konnten neueste Untersuchungen bestätigen, die für Kinder mit dem Hochrisikogenotyp HLA DR3/ DR4-DQ8 ein fünffach erhöhtes Risiko, Typ 1 Diabetes zu entwickeln, zeigen, wenn diese Kinder bereits im Säuglingsalter unter drei Lebensmonaten mit glutenhaltiger Nahrung ernährt wurden (81,122).

Während tierisches Eiweiß, Maisöl, Maisstärke und zum Teil auch Milcheiweiß die Diabetes-Inzidenz scheinbar nicht beeinflussen, werden vor allem pflanzliche Proteine aus Weizen, und der Sojabohne als diabetogen eingestuft (47,100).

Nahrungsbestandteile scheinen in der Pathogenese des Autoimmundiabetes eine Rolle zu spielen. Dies konnte sowohl bei NOD Mäusen als auch bei BB-Ratten, die ebenfalls ein Tiermodell für den humanen Typ 1 Diabetes darstellen, gezeigt werden. 1999 berichtet Funda von einem Tierexperiment, bei dem er durch eine glutenfreie Ernährung weiblicher NOD Mäuse eine signifikante Verringerung der Diabetes-Inzidenz im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche glutenhaltiges Standardfutter erhielten, erreichen konnte (37). Diese Beobachtung wurde durch Fütterungsstudien ebenfalls am Tiermodell der NOD Maus in einer Arbeitsgruppe im Institut für

Diabetesforschung in München bestätigt. Um den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem der Einsatz von glutenfreier Nahrung die größte protektive Wirkung auf die Diabetesentstehung hat, wurden drei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. In einer Versuchsgruppe wurden die Mäuse, deren Elterntiere glutenhaltige Nahrung erhalten hatten, nach der Entwöhnung von der Mutter vom Anfang der vierten Lebenswoche bis zum Lebensende glutenfrei ernährt. Eine zweite Gruppe wurde im Zeitfenster nach der Entwöhnung bis zu Beginn der zehnten Lebenswoche glutenfrei ernährt. Die Tiere der dritten Versuchsgruppe, deren Elterntiere bereits während des Zuchtvorganges, der Trächtigkeit und Stillzeit glutenfrei ernährt wurden, wurden lebenslang glutenfrei ernährt. Die Ergebnisse zeigen signifikant geringere Diabetesinzidenzen im Vergleich zu den mit der glutenhaltigen Standardnahrung ernährten Mäusen. Die Diabetesinzidenzen betrugen bei den drei genannten Versuchsgruppen mit zweiunddreißig Lebenswochen 42%, 36%, und 51%. Dagegen entwickelten 83% der Tiere aus der Kontrollgruppe Diabetes (97). Daraus lässt sich schließen, dass der Zeitraum nach der Entwöhnung bis zur zehnten Lebenswoche für die Entwicklung des Autoimmunprozesses eine entscheidende Rolle spielt.

Neueste Untersuchungen von Funda konnten den bereits beschriebenen Effekt von glutenfreier Nahrung auf die Diabetes-Inzidenz im NOD Mausmodell nicht mehr zeigen. Die von ihm durchgeführte Studie sollte beweisen, dass eine frühe Exposition von Gluten zu einer Erhöhung der Diabetes-Inzidenz bei NOD Mäusen führt. Erstaunlicherweise zeigten die Tiere, die mit einer Nahrung gefüttert wurden, deren Glutengehalt im Vergleich zur herkömmlichen Standardnahrung höher war, ebenso signifikant geringere Diabetes-Inzidenzen wie die Gruppe der glutenfrei ernährten Tiere. Die histologische Analyse der Pankreas-Organschnitte ergab aber signifikant geringere lymphozytäre Infiltrationen der Langerhans'schen Inseln der glutenfrei ernährten nicht diabetischen Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hingegen zeigten die Mäuse, welche die im Glutengehalt gesteigerte Versuchsnahrung erhielten, nur eine geringe, nicht signifikante Reduktion der lymphozyten Infiltration der Inseln (38). Schlussfolgernd lassen die Ergebnisse dieser Studie vermuten, dass der präventive Effekt von Gluten im Hinblick auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes über zwei Wirkungsmechanismen zu erklären ist. Zum einen könnte Gluten den Diabetes direkt über die Darmschleimhaut positiv beeinflussen oder indirekt durch Ernährung induzierte Veränderungen der physiologischen Darmflora. Diese Vermutung wird

unterstützt durch neueste Untersuchungen, die eine Zunahme grampositiver Darmbakterien bei glutenfrei ernährten NOD Mäusen beobachten konnten (44). Zudem berichtet Flohé über eine Verschiebung des intestinalen Zytokingleichgewichts hin zum Th1-Typ nach weizenreicher Ernährung (33). Auch Maurano berichtet über Darmerkrankungen und eine Erhöhung entzündlicher Zytokine der Darmschleimhaut bei NOD Mäusen nach weizenreicher Ernährung (73).

3.2. Einfluss von Histamin, Histamin-1- Rezeptorantagonisten und Histamin-2-Rezeptorantagonisten auf die diabetesassoziierte Autoimmunität

Histamin ist ein biogenes Amin, welches im menschlichen Organismus vielfältige Funktionen besitzt, wobei insbesondere seine Beteiligung an Abwehrreaktionen im Vordergrund steht. Auf molekularer Ebene vermittelt Histamin seine Funktionen über eine Aktivierung der Histamin-Rezeptoren H1, H2, H3 und H4, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (39,70,80,118). H1R und H2R kommen auf verschiedenen Zellen vor, so auch auf B- und T-Lymphozyten (69), wobei eine dominante Expression von H1R auf Th1- und von H2R auf Th2-Zellen beobachtet wurde (55,88). H1R-Antagonisten blockieren die Wirkung von Histamin über H1R, haben aber keinen Einfluss auf die Effekte von Histamin an H2R. Im Verhältnis zu den Histamin-1-Rezeptoren (H1R) und Histamin-2-Rezeptoren (H2R) kommen die Histamin-3- und Histamin-4-Rezeptoren (H3R und H4R) seltener vor. Da zudem ihre Funktionen noch nicht vollständig geklärt sind, sollen sie hier nicht näher beschrieben werden.

Typ 1 Diabetes ist Folge einer gestörten Immuntoleranz gegenüber den insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas, was zur Zerstörung der Inselzellen führt. Es wird davon ausgegangen, dass zunächst eine benigne Th2-mediierte Insulitis vorliegt, welche nach einer Zytokinverschiebung in Richtung Th1 in eine maligne Insulitis übergeht und es folglich zum β -Zell-Tod und Insulinmangel kommt (61). Autoantikörper und autoreaktive Entzündungszellen gegen Inselautoantigene werden durch Th1 spezifische Zytokine, wie beispielsweise Interferon γ (INF γ), reguliert.

Eine Studie an NOD Mäusen mit zerstörten H1R zeigte, dass diese Tiere nach Stimulation mit Histamin niedrigere Titer an INF- γ hatten und die Titer der Th2

spezifischen Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) verstärkt waren. Bei NOD Mäusen mit zerstörten H2R waren dagegen sowohl Th1 als auch Th2 typische Zytokine im Vergleich zu Wildtypmäusen erhöht. Schlussfolgernd kann Histamin T-Zellantworten über unterschiedliche Expression von H1R und H2 R regulieren (55). Umgekehrt lässt sich durch diese Untersuchung schlussfolgern, dass durch die Stimulation mit Histamin die INF- γ Sekretion und Zellproliferation von Th1-Zellen verstärkt und die Proliferation von Th2 –Zellen und deren Zytokinproduktion IL-4 inhibiert wird (55,98). So wäre durch die Verabreichung von Histaminrezeptorantagonisten über eine Veränderung der Immunantwort weg vom destruktiven Th1 hin zum protektiven Th2 Phänotyp ein Aufhalten des Insulitisprozesses zu erwarten.

In einer Studie am Menschen wurde, zum Erhalt der β -Zellfunktion, neun prädiabetischen Personen im Erwachsenenalter über einen Zeitraum von drei Monaten der Histamin-1-Rezeptor-Antagonist Ketotifen verabreicht. Ein protektiver Effekt auf die Diabetesmanifestation in dieser späten Phase der Krankheitsentwicklung konnte nicht beobachtet werden (14).

Auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Erkrankung Diabetes mellitus und der Wirkung von Histamin deuten Untersuchungen hin, bei denen erhöhte Histamingehalte im Plasma von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern nachgewiesen werden konnten (41).

3.3 Einfluss von Immunisierungen mit Insulin auf die diabetesassoziierte Autoimmunität bei der NOD Maus

Durch die Identifikation von unterschiedlichen Insulitisformen, einer destruktiven Th1- und einer benignen Th2 –Insulitis, wurde ein neues pathogenenetisches Konzept des Typ 1 Diabetes entwickelt, aus dem sich neue therapeutische Interventionstherapien ergeben. So versuchen derzeit weltweit durchgeführte Studien bei frisch manifestierten Erkrankten und bei Angehörigen von Typ 1 Diabetikern die destruktive Th1-Insulitis in eine benigne Th2-Insulitis umzuwandeln oder eine β -Zell spezifische Immuntoleranz zu reaktivieren.

Bereits seit Jahren versucht man im Tiermodell der NOD Maus durch antigenspezifische Therapien die Diabetesmanifestation zu verzögern oder gar zu verhindern. Verschiedene Studien berichten erfolgreich über Therapien mit dem diabetesassoziierten Autoantigen Insulin. So wurden 1990 erstmals prädiabetische NOD Mäuse mit subkutanem Schweineinsulin geimpft. Atkinson et al konnten durch diese Therapie bei weiblichen NOD-Tieren eine Reduktion der Diabetes-Inzidenz von 65% auf 8% erreichen. Durch diese Maßnahme konnte ebenfalls die Insulitisausprägung verringert werden (6). 1995 konnte Muir et al in einer Studie bei NOD Mäusen ebenfalls eine Reduktion der Diabetesinzidenz nach Behandlung mit subkutanem Insulin zeigen. Die Analyse der Pankreasorganschnitte zeigte, dass das Ausmaß der Insulitis bei den mit exogenem Insulin behandelten NOD Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht reduziert war, jedoch die Konzentration von INF- γ , dem spezifischen Zytokin der Th1-Zellen, innerhalb der pankreatischen Inseln der mit Insulin behandelten NOD Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich niedriger war (79). Ebenso wie subkutane Insulininjektionen führten wöchentliche orale Verabreichungen von Insulin bei den von Zhang et al. untersuchten NOD Tieren zu einer Reduktion der Diabetes-Inzidenz und verzögerten Diabetsmanifestation (120). Intramuskuläre Injektionen von Plasmid-DNA, die die Insulin- β -Kette kodiert, mit Inkompletten Freund'schen Adjuvants (IFA) in transgene Mäuse reduzieren die Diabetes-Inzidenz ebenfalls (23). Ähnliche positive Effekte erbrachten Injektionen von Insulin in Kombination mit IFA, einem Peptid der Insulin – β -Kette mit IFA, dem Peptid alleine und dessen intranasale Verabreichung (27,79).

Neueste Untersuchungen aus China zeigen ebenfalls einen schützenden Effekt vor Diabetes bei NOD Mäusen, die mit dem diabetes-assoziierten Autoantigen Insulin

subkutan immunisiert wurden. Ein Fortschreiten der Inselentzündung konnte durch diese Therapie nicht aufgehalten werden, obwohl die NOD Mäuse, welche mit Insulin behandelt wurden, eine geringgradige Insulitis aufzeigten. Ferner konnten höhere Titer des Th2 spezifischen Zytokins IL-4 und niedrigere Titer des Th1 typischen Zytokins INF- γ im Serum der Insulin immunisierten NOD Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren gemessen werden. (54). Die bei der Immunisierung verabreichten Stoffe scheinen regulatorische T-Zellen zu stimulieren und über deren Ausschüttung von Zytokinen eine Verschiebung von einer Th1 gewichteten hin zu einer Th 2 dominierten Immunantwort zu induzieren mit der Folge, die Zerstörung der β -Zellen und damit Typ 1 Diabetes zu verhindern.

Derzeit wird an der Universität von Florida eine Studie durchgeführt, die prüfen soll, inwieweit orales Insulin bei Hochrisikopatienten das Auftreten eines Typ 1 Diabetes verzögern oder gar verhindern kann. Es wird vermutet, dass die Verabreichung von Insulin über den Verdauungstrakt eine Art Toleranz induziert und so das Immunsystem beruhigt (95).

Aufbauend auf die seit Jahren gesammelten Erfahrungen der prädiktiven Wirkung von Insulinimmunisierungen auf die Diabetesentwicklung im Tiermodell der NOD Maus wird derzeit eine internationale Primärpräventionsstudie, die Pre-Point Studie (Primary Oral/intranasal insulin Trial) durchgeführt. In dieser ersten Antigen spezifischen Immuninterventionstudie soll die Möglichkeit einer Impfung mit Insulin gegen Typ 1 Diabetes bei Kindern mit einem sehr hohen Diabetesrisiko, welche selbst aber noch keine diabetesassoziierten Antikörper entwickelt haben, geprüft werden. Man erhofft sich durch die Insulinimmunisierung das Immunsystem zu stimulieren und eine schützende Immunantwort gegen Insulin zu induzieren. Dabei wird Insulin oral oder nasal verabreicht. Ziel der Pre-Point Studie ist es, die geeignete Insulindosis und Darreichungsform zu finden, welche dann in einer weiterführenden Präventionsstudie (Point-Studie) auf ihre Effektivität bei der Verhinderung des Autoimmundiabetes getestet wird (86).

4. Spezielle Fragestellung

Um den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Entwicklung der β -Zellautoimmunität näher zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Pankreata von NOD-Mäusen, die unterschiedlichen immunsuppressiven Therapien ausgesetzt waren, histologisch im Hinblick auf den Insulitisgrad (Infiltrationsgrad der Inseln) untersucht und ausgewertet.

Spezifische Fragestellungen:

- 1) Beeinflusst eine bezüglich des Glutengehaltes modifizierte Nahrung die Diabetesinzidenz und die Inselzellautoimmunität bei der NOD Maus?
- 2) Hat die Verabreichung von Histamin-1-Rezeptorantagonisten bei der NOD Maus einen prädiktiven Effekt auf die Diabetesinzidenz und die Inselzellautoimmunität?
- 3) Kann durch die Immunisierung von NOD Mäusen mit dem diabetesassoziierten Antigen Insulin die Diabetesinzidenz und die Inselzellautoimmunität positiv beeinflusst werden?

5. Tiermaterial, Studiendesign und Methoden zur Untersuchung des Infiltrationsgrades der Langerhans'schen Inseln und Diabetesentwicklung bei der NOD Maus unter verschiedenen immunsuppressiven Therapien

5.1. *Untersuchte Tiere*

Um den Einfluss verschiedener immunsuppressiver Therapien auf die Inselentzündung und Diabetesentwicklung im NOD Maus Modell zu analysieren, wurden die Pankreata von insgesamt 161 weiblichen Tieren im Hinblick auf den Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln lichtmikroskopisch untersucht. Zur Beurteilung eines geschlechtsspezifischen Unterschiedes bei der Inselentzündung der NOD Maus wurden zusätzlich die Pankreata von 22 männlichen Tieren untersucht. Die in die im Folgenden beschriebenen Versuchsreihen eingeschlossenen NOD Mäuse stammen aus einer Zucht des Instituts für Diabetesforschung in München. Die Zuchtpaare wurden ursprünglich von Taconics bezogen. Für alle Tierexperimente wurden die Prinzipien für die Versorgung von Tieren (NIH Publikation Nr. 85-23, überarbeitet 1985) und die nationalen Tierschutzgesetze befolgt.

Insgesamt wurden die Pankreata von 161 weiblichen und 22 männlichen NOD Mäusen im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dabei erfolgte die Organentnahme der Tiere entweder zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation oder wenn es zu keiner Diabetesentwicklung kam, bei Versuchsende bei einem Lebensalter von 32 Wochen. Die Mäuse stammten aus verschiedenen Versuchsreihen, die im Folgenden beschrieben werden. Bei der Verteilung in die Untersuchungsgruppen wurde das litter-matching Prinzip angewendet, nach dem die Nachkommen eines Wurfes in möglichst viele verschiedene Untersuchungsgruppen aufgeteilt werden. Dieses Verfahren wird angewendet, um den genetischen Hintergrund der Versuchsgruppen ähnlich zu halten. So können mögliche Effekte auf die Behandlung zurückgeführt werden und sind nicht von Besonderheiten eines Wurfes und dessen Genetik abhängig.

Für die Analyse eines geschlechtsspezifischen Unterschiedes bei der Inselentzündung im NOD Mausmodell wurden 18 weibliche und 22 Männliche Tiere untersucht. Um den Einfluss des in der Nahrung enthaltenen Glutens auf die Entwicklung der Inselautoimmunität und Diabetesmanifestation zu analysieren,

wurden 69 NOD Weibchen auf 4 Versuchsgruppen aufgeteilt. Um den Einfluss der glutenfreien Nahrung auf die Insulitis altersunabhängig untersuchen zu können, wurden zusätzlich 14 Tiere auf 2 Gruppen aufgeteilt und bis zur 12. Lebenswoche unabhängig davon, ob die Tiere Diabetes entwickelt haben, untersucht. Für den Studienteil, der den Einfluss von Histaminrezeptorantagonisten auf die Insulitis und Diabetesentwicklung analysiert, wurden 34 NOD Mäuse in vier Untersuchungsgruppen beobachtet. 23 NOD Weibchen wurden auf den protektiven Effekt von Insulinimmunisierungen auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes in 4 Untersuchungsgruppen beobachtet (Tab. 1).

Tab. 1: 161 weibliche und 22 männliche NOD Mäuse wurden im Alter von 3 Lebenswochen auf 5 Therapiestudien aufgeteilt.

Untersuchungsgruppe	n =	Therapie
1 Einfluss des Geschlechts auf die Autoimmunität des Typ 1 Diabetes (n = 40)		
1 A	18	weibliche unbehandelte Tiere
1 B	22	männliche unbehandelte Tiere
2 Glutenmodifikation in der Ernährung (n = 68)		
2 A	12	glutenfrei ab 3. Lebenswoche
2 B	11	glutenfrei 3. – 10. Lebenswoche
2 C	23	glutenfrei lebenslang
2 D	22	unbehandelt
3 Glutenmodifikation in der Ernährung Exitus mit 12 Lebenswochen n = 14		
3 A	7	glutenfrei
3 B	7	unbehandelt
4 Gabe von Histamin Rezeptorantagonisten über das Trinkwasser (n = 34)		
4 A	9	Histamin-1-Rezeptorantagonist
4 B	9	Histamin-2-Rezeptorantagonist
4 C	8	nur mit DT immunisiert
4 D	8	unbehandelt
5 Immunisierung mit diabetesassoziierten Antigenen (n=23)		
5 A	4	GAD
5 B	4	Glucagon
5 C	4	Insulin
5 D	6	PNMT
5 E	5	IA 2 β

5.2. Studiendesign

5.2.1. Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung auf die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes bei der NOD Maus

5.2.1.1. Beschreibung des Versuchsaufbaus

Ziel dieses Projektes war es zu prüfen, ob durch eine glutenfreie Ernährung die Insulitis und die Diabetesentwicklung im NOD Mausmodell reduziert werden kann.

Die Studie gliedert sich in 4 Versuchsgruppen mit 3 Wochen alten weiblichen NOD Mäusen.

Die Muttertiere der Mäuse aus 3 Versuchsgruppen wurden während der Verpaarung, Trächtigkeit und Stillzeit mit der glutenthaltigen Standardnahrung ernährt. Deren weibliche Nachkommen wurden nach der Entwöhnung im Alter von 3 Wochen gleichmäßig auf folgende Versuchsgruppen aufgeteilt: Die Tiere der Gruppe 2 A (n = 12) erhielten nach der Entwöhnung bis zum Versuchsende (32. Lebenswoche) eine glutenfreie Versuchsnahrung. In Gruppe 2 B (n = 11) wurde das glutenfreie Futter für 7 Wochen im Zeitraum direkt nach der Entwöhnung (3. bis 10. Lebenswoche) verabreicht. Im Anschluss erhielten die Tiere bis zum Versuchsende glutenthaltige Standardnahrung. Die NOD Weibchen der Gruppe 2 D (n = 22) erhielten lebenslang glutenthaltige Standardnahrung und wurden als unbehandelte Kontrollgruppe geführt. Die Elterntiere einer vierten Versuchsgruppe (Gruppe 2 C, n = 24) erhielten während des Zuchtvorgangs bereits die glutenfreie Nahrung und deren Nachkommen bekamen lebenslang glutenfreies Futter angeboten (Abb. 3A).

Der Untersuchungszeitraum war auf zweiunddreißig Lebenswochen begrenzt. Bei Versuchsende oder vorzeitiger Diabetesmanifestation wurden die Tiere getötet und das Pankreas für die weitere Untersuchung zur Bestimmung des Infiltrationsgrades der Langerhans'schen Inseln entnommen (siehe 5.2; 5.3).

Den Tieren wurde zur Bestimmung der Insulinautoantikörper und Gliadin-Antikörper im Alter von zehn und achtzehn Wochen aus der Augenvene sowie bei Exitus aus der Vena Cava Blut entnommen. Da die Antikörperbestimmung nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen.

Um den Einfluss der glutenfreien Nahrung auf die Insulitisentwicklung altersunabhängig untersuchen zu können, wurden in einer weiteren Versuchsreihe

Mäuse analysiert, die alle gleichen Alter waren. Die Elterntiere dieser Mäuse erhielten während des Zuchtvorgangs glutenhaltiges Futter. Deren Nachkommen wurden im Alter von 3 Wochen gleichmäßig auf folgende 2 Versuchsgruppen aufgeteilt:

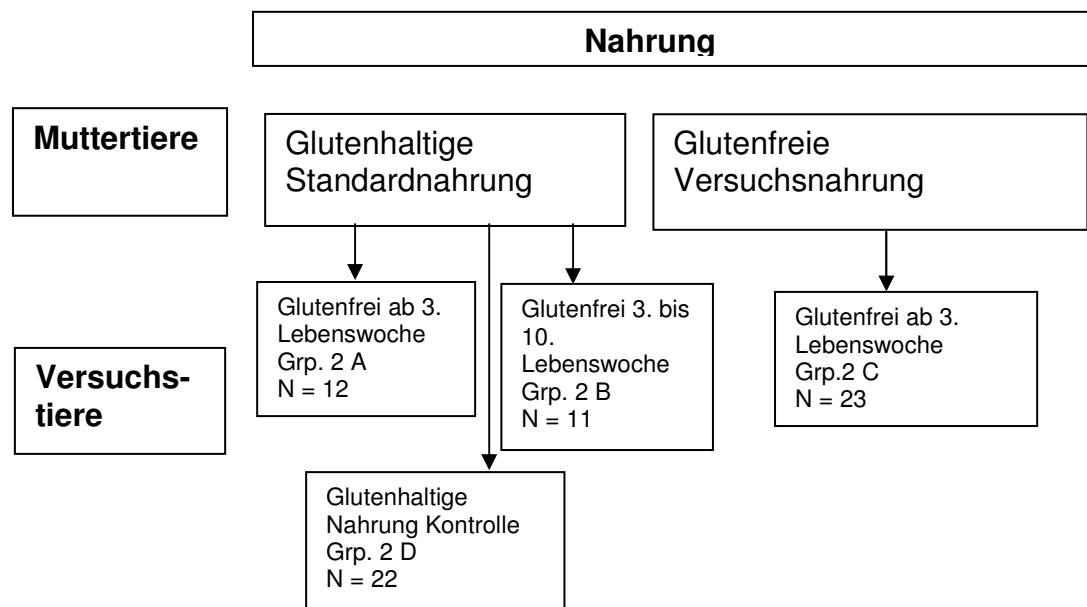
Gruppe 3 A (n = 7) erhielt ab dem Zeitraum nach der Entwöhnung (3. bis 12. Lebenswoche) glutenfreies Futter, während die Tiere der Gruppe 3 B (n = 7) von der 3. bis 12. Lebenswoche weiterhin glutenhaltige Standardnahrung angeboten bekamen und als unbehandelte Kontrollgruppe geführt wurden (Abb.3B)

Der Beobachtungszeitraum war, im Vergleich zum vorherig beschriebenen Projekt, auf 12 Lebenswochen, unabhängig davon, ob die Tiere Diabetes entwickelten, begrenzt.

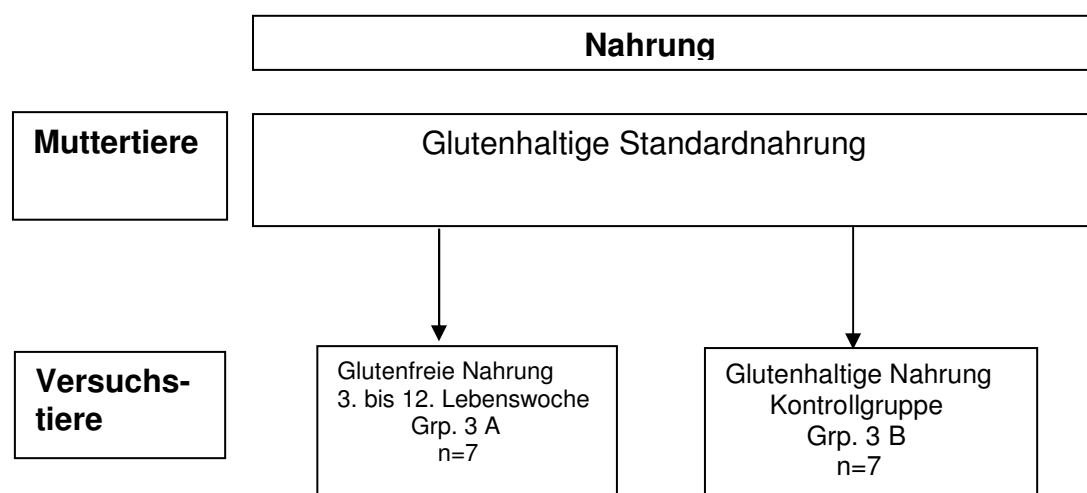
Den Tieren wurde bei Exitus das Pankreas zur Untersuchung der Insulitis entnommen. Auch Antikörpermessungen wurden durchgeführt, die hier nicht näher beschrieben werden.

Abb. 3: Behandlungsschema und Gruppeneinteilung der Muttertiere und der Versuchstiere

A.



B.



5.2.1.2. Beschreibung der Nahrungszusammensetzung

In enger Kooperation mit der Firma Altromin (Lage, Deutschland) wurde durch Modifikation der Standardnahrung Altromin 1324 für Ratten und Mäuse die Versuchsnahrungen konzipiert. Der Weizenanteil der Standardnahrung beträgt 32% (mündliche Auskunft von Herrn Dr. Madry; Gesellschaft für Tierernährung Altromin). Glutenfreies Futter wurde hergestellt, indem alle glutenhaltigen Inhaltsstoffe wie Weizen, Weizenkleie und Gerste durch Maisstärke als Kohlenhydratquelle ersetzt wurden. Als Eiweißträger wurde Geflügelfleischmehl verwendet. Die Nährstoffgehalte der Standardnahrung und der Versuchsnahrung sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Zusammensetzung der Versuchs- und Standardnahrung

	glutenfreie Nahrung	Standardnahrung
Energie (kcal/kg)	3151	2919
Protein (g/kg)	187	180
Kohlehydrate (g/kg)	511	491
Fett (g/kg) Total	39	39
Weizen %	-----	32%

5.2.2. Einfluss eines Histamin-1- und Histamin-2-Rezeptorantagonisten auf die diabetesassoziierte Autoimmunität im NOD Mausmodell

Für diesen Therapieansatz wurden der Histamin-1-Rezeptorantagonist (H1R-Antagonist) Doxylamin (Doxylamine Succinate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und der Histamin-2-Rezeptorantagonist (H2R-Antagonist) Ranitidin (Ranitidin Hydrochloride, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verwendet und den NOD Mäusen über das Trinkwasser verabreicht.

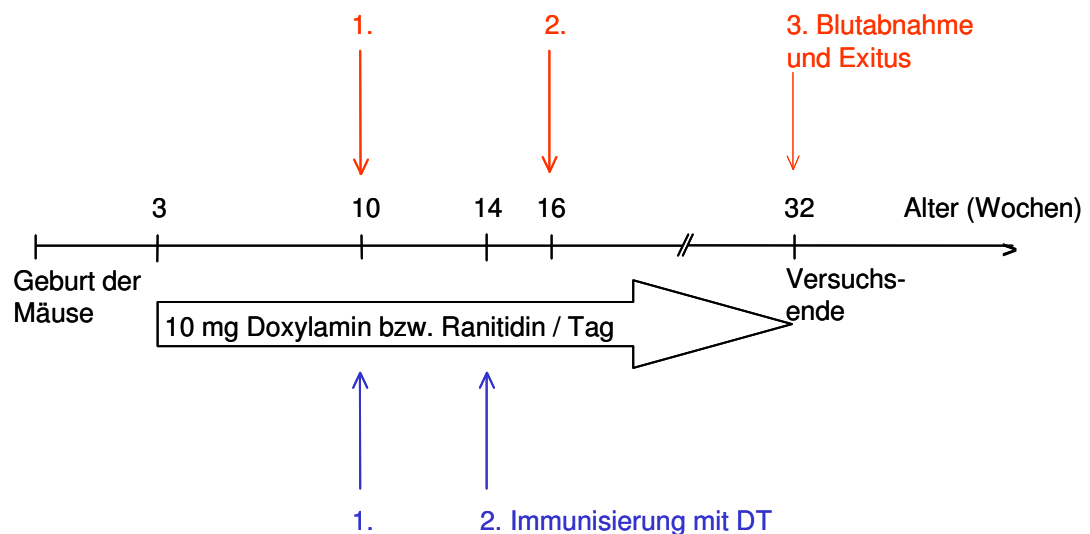
Weibliche NOD-Mäuse wurden nach der Entwöhnung im Alter von 3 Lebenswochen in 4 Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Tiere der ersten Untersuchungsgruppe (Gruppe 4 A; n = 11) erhielten pro Tag und Tier 10 mg Doxylamin in 6 ml Leitungswasser gelöst. Die NOD Weibchen der zweiten Versuchsgruppe (Gruppe 4 B; n = 9) wurden pro Tag und Tier mit 10 mg Ranitidin in 6 ml Leitungswasser gelöst behandelt. Der jeweilige Wirkstoff wurde den Mäusen lebenslang verabreicht. Zusätzlich gab es zwei Gruppen, die keine Wirkstoffe zugeführt bekamen: Gruppe 4 C (n = 11) und Gruppe 4 D (n = 10). Um neben den autoimmunen IAA einen zusätzlichen Marker für die Analyse der Immunantwort nach Histaminrezeptor-Blockierung zu induzieren, wurden alle Tiere der Gruppe 4A, 4B und 4C mit zehn und vierzehn Lebenswochen mit einem Diphtherie-Tetanus-Toxoid subkutan immunisiert. Das an Aluminiumhydroxid adsorbierte Diphtherie-Tetanus-Toxoid (DT-Impfstoff Mérieux für Kinder; Aventis Pasteur MSD) wurde 1:22,5 mit NaCl (B. Braun Melsungen AG) verdünnt. Den Mäusen wurden pro Immunisierung 125 µl dieser Verdünnung durch zwei Einstiche in die Leistengegend injiziert. So wurden jeweils 0,45 IE Tetanus-Toxoid und 0,34 IE Diphtherie-Toxoid verabreicht.

Die Tiere der Gruppe 4 D (n = 8) erhielten Leitungswasser ohne Wirkstoffzusatz und wurden nicht mit dem Diphtherie-Tetanus-Toxoid immunisiert. Sie bilden für diese Versuchsreihe die Kontrollgruppe.

Für die Antikörpermessungen gegen das Autoantigen Insulin und Tetanustoxoid erfolgten bei allen Tieren im Alter von zehn und sechzehn Lebenswochen sowie bei Exitus Blutabnahmen. Da die Bestimmung der Antikörper nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen.

Die NOD Mäuse wurden zweiunddreißig Wochen beobachtet und bei vorzeitiger Diabetesmanifestation oder am Versuchsende getötet. Für die Bestimmung des Infiltrationsgrades der Langerhans'schen Inseln unter dieser Therapie erfolgte sodann die Entnahme des Pankreas (siehe 4.2; 4.3).

Abb. 4: Behandlungsplan für weibliche NOD Mäuse mit Histaminrezeptoren-Antagonisten



5.2.3. Immunisierung von NOD Mäusen mit diabetesassoziierten Antigenen und Kontrollantigenen und deren Einfluss auf die Entwicklung des autoimmunen Diabetes

Für die Analyse der protektiven Wirkung von exogenem Insulin auf die Entwicklung der Inselautoimmunität bei Typ 1 Diabetes im Vergleich zu anderen diabetesassoziierten Antigenen oder Kontrollantigenen wurden 23 weibliche NOD Mäuse in 5 Untersuchungsgruppen aufgeteilt und mit den diabetesassoziierten Antigenen Insulin, Glutamatdecarboxylase (GAD) und Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 β (IA-2 β) und den Kontrollantigenen Glucagon und Phenolethanolamin-N-Methyl-Transferase (PNMT) immunisiert. Die Tiere der Gruppe 5 A (n= 4) wurden mit GAD immunisiert, Gruppe 5 B (n=4) mit Glucagon, Gruppe 5 C (n=4) mit Insulin, Gruppe 5 D (n = 6) mit PNMT und Gruppe 5 E (n = 5) erhielt IA-2 β als Antigen.

Die erste Immunisierung erfolgte im Alter von 4 Wochen. Die drei weiteren Immunisierungen erfolgten im Abstand von jeweils einer Woche in der fünften, sechsten und siebten Lebenswoche der Tiere. (siehe Abb. 5).

Alle Antigenlösungen wurden bei der Immunisierung in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingesetzt. Die Stammlösungen der Proteine wurden direkt vor der jeweiligen Immunisierung mit Aqua ad iniectabilia verdünnt.

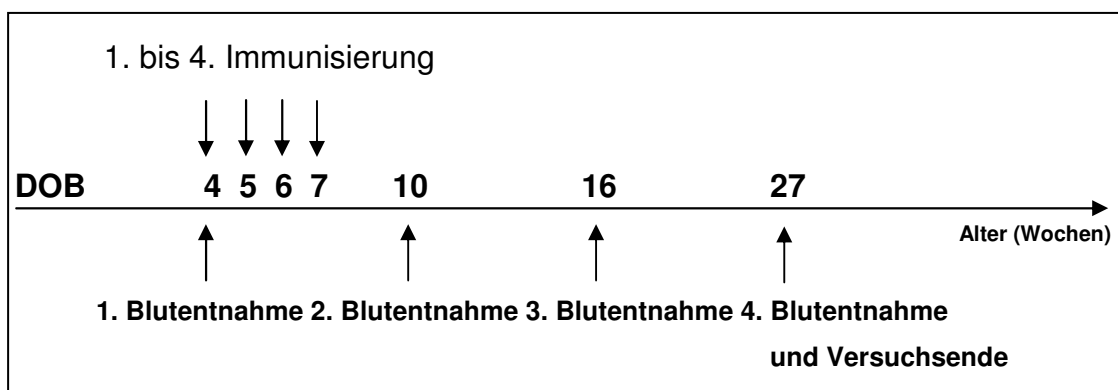
Das IA-2 β Protein wurde zunächst vorbehandelt, da es in mehreren Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt. Alle Lösungen wurden vereinigt und das Protein gefriergetrocknet. Dazu wurde die Gesamtlösung in einen Rundkolben gebracht und durch Tauchen in flüssigen Stickstoff gefroren. Das IA-2 β Protein wurde so in dem Rundkolben für circa 6 Stunden an eine Gefriertrocknungsapparatur (Lyophilisator) angeschlossen. Das Protein wurde mit Aqua ad iniectabilia in der gebrauchsfertigen Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Pro Immunisierung wurde den Mäusen jeweils 100 μl Antigenlösung in Kombination mit 100 μl Inkomplettem Freund`schem Adjuvants injiziert. Durch einen Einstich in die rechte und einen Einstich in die linke Leistengegend wurde den Mäusen jeweils die Hälfte der Immunisierungslösung verabreicht. Auf diese Weise wird eine bessere Verteilung der Immunisierungslösung unter der Haut erzielt.

Der Untersuchungszeitraum war auf 27 Wochen begrenzt und die Tiere wurden bei Versuchsende oder vorzeitiger Diabetesentwicklung getötet. Es erfolgte die Entnahme des Pankreas für die Untersuchungen des Infiltrationsgrades der Langerhans'schen Inseln unter dieser Therapie (siehe 4.2; 4.3).

Für die Antikörperanalysen wurden vier Blutabnahmen vorgesehen. Die erste wurde unmittelbar vor der ersten Immunisierung durchgeführt. Die zweite und dritte Blutabnahme erfolgte in der zehnten und sechzehnten Lebenswoche der NOD Mäuse. Die letzte Blutabnahme fand am Versuchsende im Alter von 27 Lebenswochen statt. Da die Antikörpermessungen nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen.

Abb.5: Zeitstrahl des NOD Mäuse Immunisierungsprojekts:



5.2.4. Behandlung und Nachverfolgung der NOD Mäuse in allen Behandlungs- und Kontrollgruppen

Im Verlauf aller beschriebener Interventionsstudien wurden die Tiere zur Bestimmung der Diabetes-Inzidenz ab einem Alter von 10 Wochen 3 mal wöchentlich auf das Vorliegen einer Glukosurie mit Hilfe von Teststäbchen (Diabur Test 5000, Roche) getestet. Dabei galten zwei aufeinander folgende Urin-Glukosewerte von $> 5,5$ mmol/l und als Bestätigung ein Blut-Glukosespiegel (Messgerät: Glucometer Elite, Bayer, Leverkusen) von $> 13,9$ mmol/l als positiv für das Vorliegen eines Diabetes. Alle Tiere wurden entweder bei manifestem Diabetes oder Ende des jeweiligen Untersuchungszeitraums getötet und deren Milz, Pankreas und Blut für weitere Untersuchungszwecke entnommen (siehe 5.2). Von den Pankreata wurden für die Analyse der Stadien der Insulitis, Haematoxylin und Eosin gefärbte Organschnitte angefertigt (siehe 5.3).

5.3. Exitus bei Diabetesmanifestation oder am Versuchsende mit Organentnahme

Die NOD Mäuse der beschriebenen Versuchsreihen werden in einer Schachtel mit Trockeneis getötet. Der Mäusekörper wird mit 80%igem Ethanol abgespült und auf dem Rücken liegend auf ein Korkbett fixiert. Die äußere Haut wird mit einer Schere abpräpariert, so dass die Bauchmuskulatur frei liegt. Mit einer feinen Schere wird nun die Bauchhöhle eröffnet und der Darm auf die linke Seite verlagert. Unter der hochgeklappten Leber erscheinen Milz und Pankreas. Da die beiden Organe eng miteinander verbunden sind, werden sie beide mit einer Pinzette erfasst und herausgelöst. Das Pankreas wird von der Milz abgetrennt und in Einbettkassetten (universal; Langenbrinck) eingeklemmt. Das eingebettete Pankreas wird in einer 4%igen Formaldehydlösung (neutral gepuffert; Fa. SAV) bis zur weiteren Verarbeitung kultiviert. Die Milz wird zur Gewinnung von Milzzellen verwendet. Diese Zellen werden bei -80° eingefroren. In dieser Form gelagert, behalten die Zellen über mehrer Jahre ihre Lebensfähigkeit und können für weitere Untersuchungen herangezogen werden, die nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

5.4. Anfertigung der murinen Pankreasparaffinschnitte

Die eingebetteten in 4 %iger Formaldehydlösung gelagerten Pankreata werden in die Pathologie im Krankenhaus München Schwabing überführt und in Paraffin eingebettet. Zuvor werden die Pankreata in einer Entwässerungsmaschine (Hypercenter 2; Shandon GmbH, Frankfurt) über Nacht in einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entfernung der Formaldehydlösung schrittweise gewaschen. Anschließend werden die Pankreata aus ihren Einbettkassetten heraus genommen, in Schälchen gelegt und von einem Gewebeeinbettssystem (Tissue-Tek III; Miles) in Paraffin eingebettet. Für eine optimale Schneidetechnik werden die Paraffinblöcke für die Anfertigung der Organschnitte auf einer Kühlplatte (Hetofrig; Danmark) gekühlt. Die gekühlten Organe werden mit Einbettmedium am Schneideblock des Schlittenmikrotom (Schlittenmikrotom Modell Hn 40; R. Jung AG, Heidelberg) befestigt. Es werden Schnitte von, je nach Qualität der Organe, in 2 bis 3 μm Dicke angefertigt. Die Organschnitte werden mit einem Pinsel von der Klinge (Mikrotomklingen S35; 50 Blades x 10; Barmer; Fa. Seidel) abgenommen und für einige Sekunden in ein 40 °C warmes Wasserbad (Paraffinstreckbad 1052; Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) gelegt. Die Schnitte werden aus dem Wasserbad auf einen Objektträger (SuperFrost 76x26 mm / 3x1 inch; Fa. Langenbrinck; Emmendingen) gezogen und luftgetrocknet. Für die histologische Auswertung werden von jedem Tier in drei verschiedenen Ebenen, mit jeweils 30 Schnitten Abstand zueinander, je zwei Schnitte pro Ebene angefertigt. Die mit den Organschnitten behafteten Objektträger werden in eigens dafür vorgesehene Objektträgerständer gestellt und im Färbeautomaten (Varistain 24-6; Shandon GmbH, Frankfurt) mit den Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Abschließend werden vom Eindeckautomaten (Promounter RCM 2000; Coverslipping Machine) Deckgläschen (Mediate Automaten; 24x55 mm; Fa. Langenbrinck; Emmendingen) auf die Objektträger geklebt.

5.5. Bestimmung des Insulitisgrades

Zur Bestimmung des Insulitisgrades (Infiltrationsgrades) wurden von jedem Tier mindestens 10 verschiedene Inseln ausgewertet. Bei einigen Tieren war dies aufgrund der hochgradigen Zerstörung der Inseln nicht möglich. In diesen Fällen wurden mindestens 4 verschiedene Inseln ausgewertet oder die Tiere wurden in die Auswertung nicht mit einbezogen. Bei der mikroskopischen Auswertung der Pankreata erfolgte die Einstufung der Inseln folgendermaßen:

- Grad 0 : Keine Infiltration von Lymphozyten

- Grad 1: Periinsuläre Infiltration von Lymphozyten

- Grad 2: intrainsuläre Infiltration von Lymphozyten bis zu 50% der
 Inselfläche

- Grad 3: intrainsuläre Infiltration von Lymphozyten in mehr als 50% der
 Inselfläche

Abb. 4

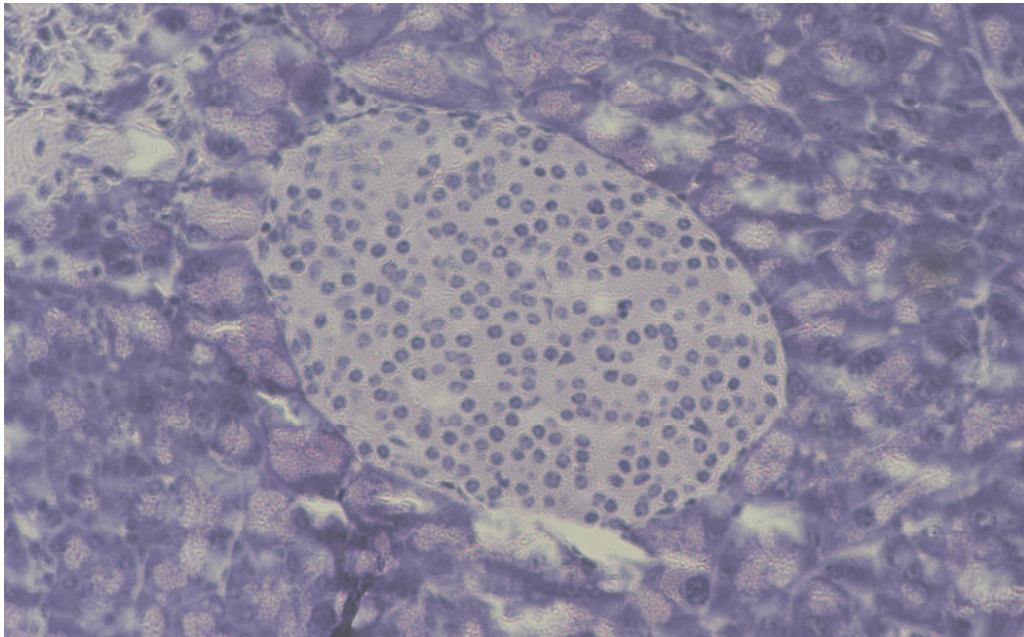


Abb. 4: Dargestellt ist eine Langerhans'sche Insel des Pankreas einer NOD Maus. Die Insel ist frei von Lymphozyten. Dies entspricht einem Insulitisgrad 0.

Abb. 5

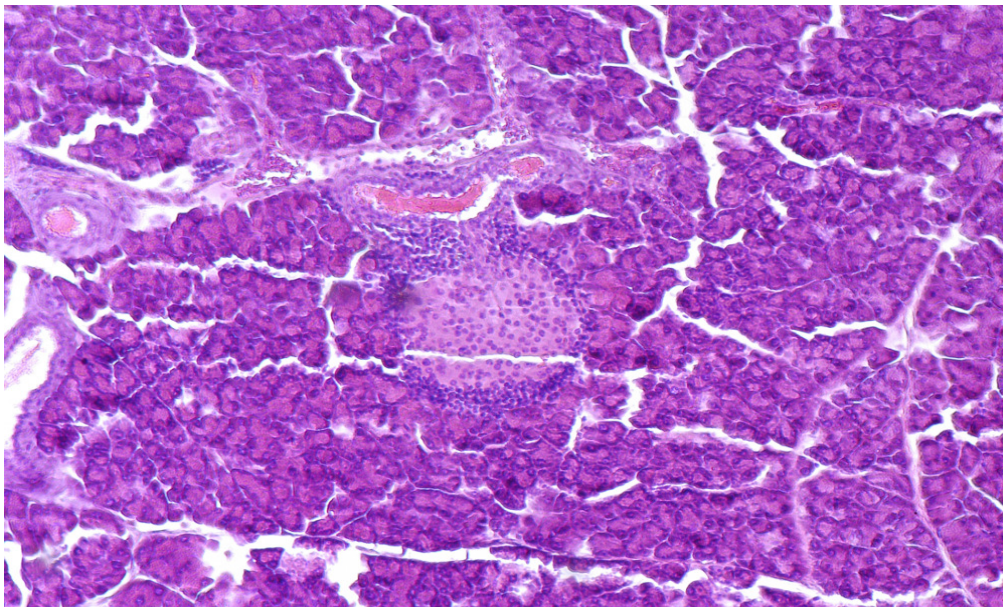


Abb. 5: Dargestellt ist eine Langerhans'sche Insel des Pankreas einer NOD Maus. Die Lymphozyten sind um die Insel herum angeordnet, was als Periinsulitis bezeichnet wird. Dies entspricht einem Insulitisgrad 1.

Abb. 6

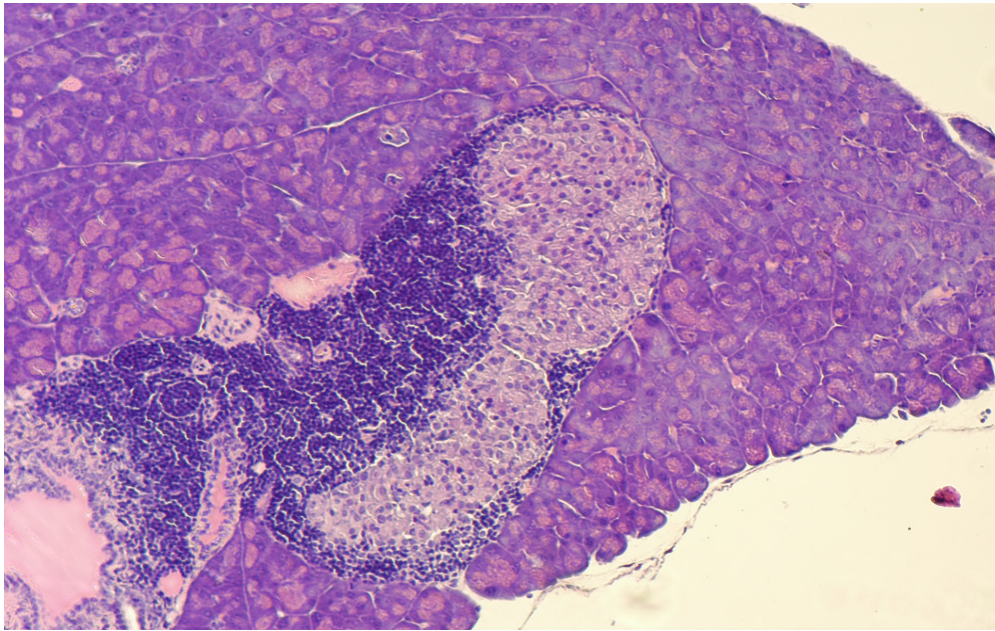


Abb. 6: Dargestellt ist eine Langerhans'sche Insel des Pankreas einer NOD Maus. Ausgehend vom Gefäßpol infiltrieren die Lymphozyten die Insel. Da weniger als 50% der Inselfläche von dem entzündlichen Infiltrat ausgefüllt sind, spricht man von einem Insulitisgrad 2.

Abb. 7

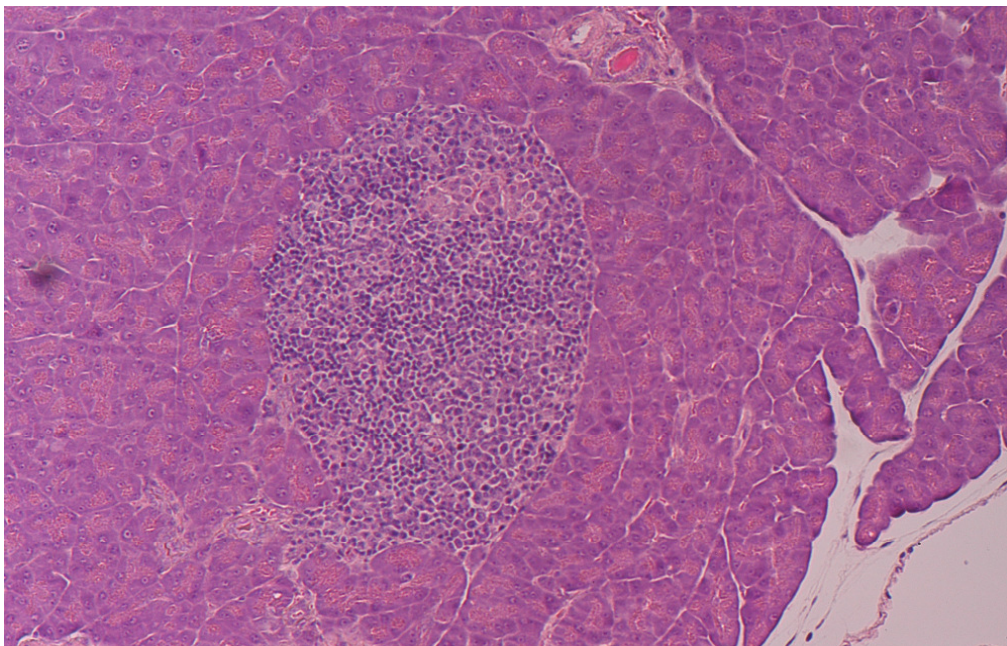


Abb. 7: Dargestellt ist eine Langerhans'sche Insel des Pankreas einer NOD Maus. Die Insel ist nahezu vollständig von dem entzündlichen Infiltrat ausgefüllt. Dies entspricht einem Insulitisgrad 3.

Der mittlere Insulitisgrad der einzelnen Tiere wurde errechnet, indem die Anzahl der Inseln, die einen bestimmten Insulitisgrad aufweisen, mit der entsprechenden Anzahl multipliziert wurde. Die Ergebnisse für die verschiedenen Insulitisgrade wurden addiert. Der mittlere Insulitisgrad ergibt sich, wenn man die sich aus der Addition ergebenden Summe durch die Gesamtzahl der von diesen Tieren ausgewerteten Inseln teilt.

Mittlerer Insulitisgrad: $\frac{\sum_{n=0}^4 nG_n}{\sum_{n=0}^4 G_n}$ mit G_n = Anzahl der Inseln des Grades n .

5.6. Statistik

In Abhängigkeit von der Fragestellung erfolgte die Überprüfung der statistischen Signifikanzen mit verschiedenen Tests. Die statistischen Daten wurden mit Hilfe des Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, USA) bzw. des Programms Prism™ (Version 4.03, GraphPad Software Inc. 2005) ermittelt. Unterschiede wurden bei einem p-Wert < 0,05 als signifikant eingestuft.

Die Vergleiche der Insulitisgrade zwischen den Versuchsgruppen bei der NOD Maus erfolgten mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U Tests. Für die Berechnung der Diabetesinzidenzen zwischen den Gruppen wurden der χ^2 -Test und der exakte Test von Fischer angewendet. Für die Analyse der Insulitisgrade in Assoziation zur Diabetesentwicklung zwischen den Untersuchungsgruppen bei der NOD Maus wurden Überlebenskurven nach Kaplan-Meier benutzt. Signifikanzen der Insulitisscores und der Diabetesfrequenz im Vergleich wurden mittels log-rank Test geprüft.

6. Ergebnisse

6.1 Insulitishäufigkeit und Diabetesmanifestation in unbehandelten NOD Mäusen unterschiedlichen Geschlechts

Für die Analyse ob es im Hinblick auf den Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln und der Diabetesmanifestation einen geschlechtsspezifischen Unterschied bei der NOD-Maus gibt, wurden 18 weibliche und 22 männliche NOD-Mäuse, die keiner Behandlung ausgesetzt waren, untersucht. Von den Pankreata dieser Tiere wurden He-gefärbte Organschnitte angefertigt und mit Hilfe des Lichtmikroskops im Hinblick auf den Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln untersucht. Für die Auswertung der Inseln wurde ein Insulitisgrad von 0 bis 3 festgelegt. Von jedem Tier wurden mindestens 10 verschiedene Inseln ausgewertet.

Für die Bestimmung der Diabetesmanifestation wurden die Tiere über einen Beobachtungszeitraum von maximal 38 Wochen ab der 10. Lebenswoche zweimal wöchentlich mit Glukosemessstreifen auf Glukoseausscheidung im Urin kontrolliert. Zwei aufeinander folgend positive Messergebnisse wurden als Diagnose eines manifesten Diabetes definiert.

6.1.1 Insulitishäufigkeit bei unbehandelten NOD Mäusen unterschiedlichen Geschlechts

Der Insulitisgrad der Langerhans'schen Inseln war bei den unbehandelten männlichen NOD Mäusen im Vergleich zu den weiblichen Tieren signifikant geringer ($p = 0,008$). 36,4% (8/22) der männlichen NOD Mäuse zeigten einen Insulitisgrad von 0 (keine lymphozytäre Infiltration der Inseln), und 50% (11/22) einen Insulitisgrad von 1 (periinsuläre Infiltrate) im Vergleich zu 11,1% (2/18) und 55,6% (10/18) der weiblichen Tiere. 33,6 % (6/18) der weiblichen NOD Mäuse hatten einen Insulitisgrad von 2 (intrainsuläre lymphozytäre Infiltration bis 50% der Inselfläche) im Vergleich zu 13,6% (3/22) der männlichen Tiere (Abb. 1).

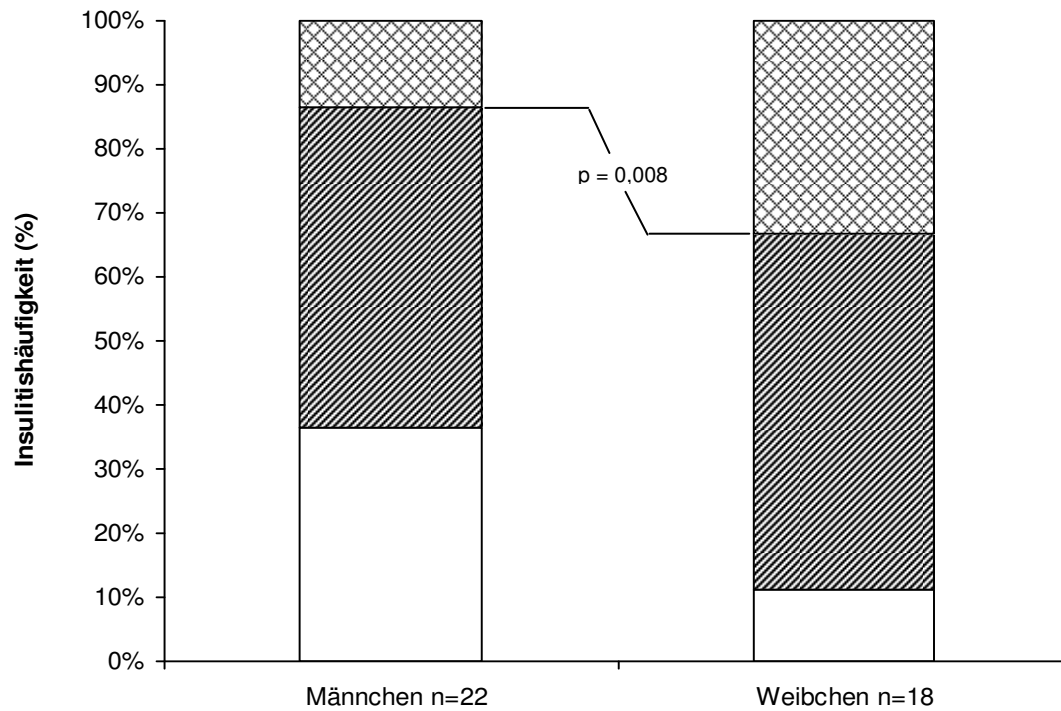


Abb.1: Insulitishäufigkeit unbehandelter NOD Mäuse unterschiedlichen Geschlechts. Dargestellt ist die Insulitis-Häufigkeit in Prozent in unbehandelten männlichen und weiblichen NOD Mäusen. Der weiße Balkenanteil stellt die Anzahl der Tiere mit einem Insulitisgrad von 0, der dunkel schraffierte Balkenanteil die mit einem Insulitisgrad von 1 und der gekreuzt schraffierte Balkenanteil die mit einem Insulitisgrad von 2 dar.

6.1.2 Häufigkeit der Diabetesentwicklung in unbehandelten NOD Mäusen unterschiedlichen Geschlechts

Die Auswertung ergab eine hoch signifikant geringere Diabeteshäufigkeit bei den männlichen Tieren im Vergleich zu den weiblichen NOD Mäusen ($p = 0,0001$). Nur 1 von 22 männlichen Tieren entwickelte im Alter von 24 Wochen einen Diabetes (4,4%), während bei den weiblichen NOD Mäusen während des Beobachtungszeitraums 14 von 18 Tieren diabetisch wurden (77,8%) (Abb. 2).

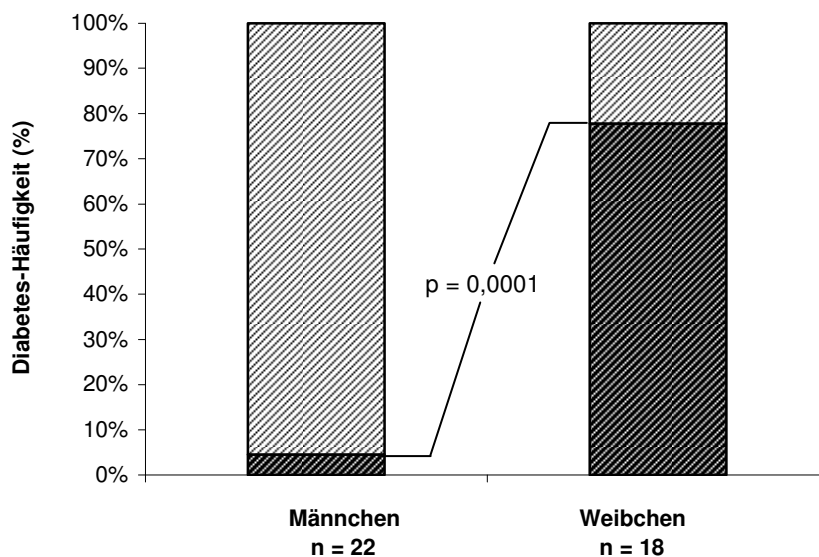


Abb. 2: Häufigkeit der Diabetesentwicklung in unbehandelten NOD Mäusen unterschiedlichen Geschlechts

Dargestellt ist die Diabetesmanifestation in Prozent bei unbehandelten männlichen und weiblichen NOD Mäusen. Der dunkel schraffierte Balkenanteil zeigt die Anzahl der Tiere, die an Diabetes erkrankt sind. Der hell schraffierte Balkenanteil stellt die Anzahl der nicht diabetischen Tiere da. Es besteht eine hoch signifikant geringere Diabeteshäufigkeit bei den männlichen Tieren im Vergleich zu den weiblichen Tieren.

6.1.3 Kumulative Diabetesinzidenz in Abhängigkeit des Infiltrationsgrades der Langerhans'schen Inseln bei unbehandelten NOD Mäusen unterschiedlichen Geschlechts

Die Diabetes-Inzidenz der männlichen NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad ≤ 1 liegt signifikant unter der Diabetes-Inzidenz der weiblichen Mäuse mit einem solchen Insulitisgrad ($p = 0,0001$). Während 82% (9/18) der weiblichen Tiere Diabetes entwickelten, haben lediglich 5% (1/22) der männlichen NOD Mäuse Autoimmundiabetes entwickelt. Zudem ist die Diabetes-Inzidenz der männlichen Mäuse mit einem Insulitisgrad ≤ 1 signifikant niedriger ($p = 0,0001$) als die Diabetes-Inzidenz der weiblichen NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad >1 .

Es besteht allerdings kein signifikanter Unterschied in der Diabetes-Inzidenz zwischen weiblichen Mäusen mit einem Insulitisgrad ≤ 1 und weiblichen NOD Mäusen mit einem Insulitisgrad > 1 ($p = 0,603$). Ebenso besteht bei den männlichen Tieren keine Assoziation der Diabetes-Inzidenz mit dem Insulitisgrad der Langerhans'schen Inseln ($p = 0,751$). Da nur 2 männliche nicht diabetische Mäuse einen Insulitisgrad > 1 hatten, konnten diese nicht in die Graphik (Abb.3) mit einbezogen werden.

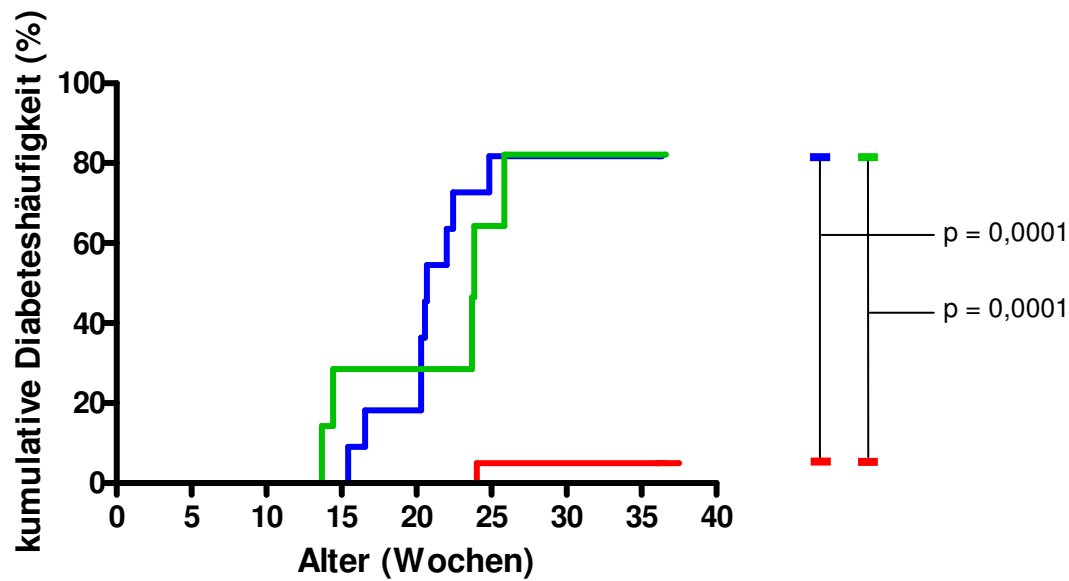


Abb. 3: Kumulatives Diabetesrisiko in Assoziation zur Insulitis der unbehandelten NOD Mäuse in Abhängigkeit zum Geschlecht. Die rote Linie repräsentiert die männlichen Mäuse mit einem Insulitisgrad ≤ 1 . Die grüne Linie repräsentiert die weiblichen Mäuse mit einem Insulitisgrad > 1 und die blaue Linie die weiblichen Mäuse mit einem Insulitisgrad ≤ 1 . 2 männliche Mäuse mit einem Insulitisgrad > 1 hatte keinen Diabetes entwickelt und können aufgrund der geringen Anzahl nicht dargestellt werden.

6.2 Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung auf die Entwicklung eines autoimmunen Diabetes bei der NOD Maus

In diesem Versuchsprojekt sollte untersucht werden, inwieweit eine bezüglich des Glutengehaltes veränderte Nahrung den Insulitisprozess und die Diabetesentwicklung bei der NOD Maus beeinflusst.

Die Mäuse wurden in 4 Versuchsgruppen aufgeteilt. Gruppe 2 A erhielt ab der 3. Lebenswoche die glutenfreie Versuchsnahrung. In Gruppe 2 B wurde die glutenfreie Nahrung von der 3. bis zur 10. Lebenswoche verabreicht, anschließend bekamen die Tiere wieder Standardnahrung angeboten. Die Mäuse der Gruppe 2 C, deren Elterntiere bereits glutenfrei ernährt wurden, erhielten während des gesamten Beobachtungszeitraumes (32 Lebenswochen) glutenfreies Futter. Die Tiere der Gruppe 2 D wurden lebenslang mit der Standardnahrung gefüttert und bilden die Kontrollgruppe.

Um den Einfluss einer glutenfreien Ernährung über verschiedene Zeiträume auf den Insulitisprozess und die Diabetesentwicklung bei der NOD Maus zu untersuchen, wurden zunächst die drei Untersuchungsgruppen 2 A (glutenfrei Ernährung ab der 3. Lebenswoche), 2B (glutenfreie Ernährung von der 3. bis zur 10. Lebenswoche) und 2C (lebenslange glutenfreie Ernährung) analysiert. Im Hinblick auf den Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ein Insulitisgrad von 0 und 1 konnte bei den NOD Mäuse der drei Versuchsgruppen in ähnlich gleichem Maße gefunden werden (58,3% (2A) vs 54,5% (2B) vs 52,2 (2C)). Hinsichtlich der Manifestation eines Diabetes konnte ebenso kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (41,1% (2A) vs 36,4% (2B) vs 47,8%(2C)).

Da bei den drei Gruppen kein Unterschied im Hinblick auf die Insulitisentwicklung und Diabetesmanifestation besteht, werden die drei Gruppen zusammengefasst hinsichtlich des Einflusses von Gluten auf die Insulitis- und Diabetesentwicklung mit der Kontrollgruppe verglichen.

6.2.1 Einfluss einer bezüglich des Glutengehaltes modifizierten Nahrung auf die Diabetesinzidenz bei der NOD Maus

Unabhängig davon, ob die Tiere lebenslang glutenfrei ernährt wurden, oder nur für einen bestimmten Zeitraum glutenfreies Futter angeboten bekamen, konnte durch eine glutenfreie Ernährung der NOD Mäuse eine hoch signifikante Verringerung der Diabetesinzidenz erzielt werden ($p = 0,004$).

Nur 43,5% (20/46) der irgendwann glutenfrei ernährten Mäuse (Gruppe 2A,B,C) entwickelten einen Diabetes. Dagegen betrug die Diabeteshäufigkeit in der Kontrollgruppe (Gruppe 2D) 81,8% (18/22) (Abb. 4).

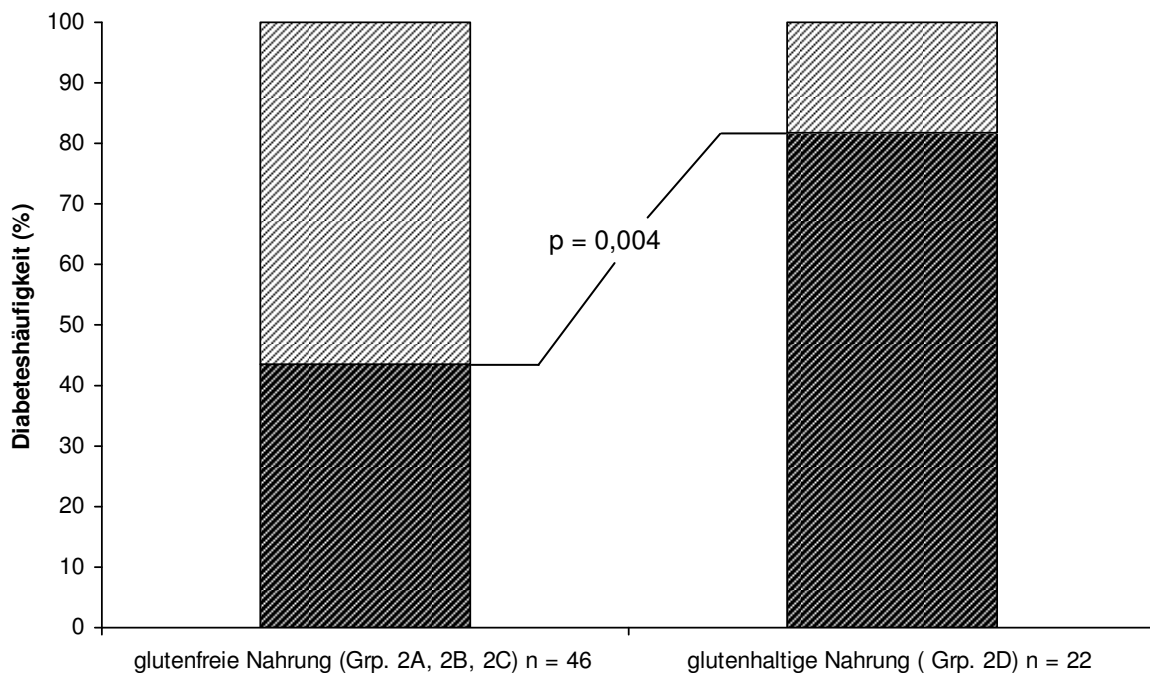


Abb. 4: Diabetesinzidenz weiblicher NOD Mäuse in Bezug auf eine im Glutengehalt modifizierte Nahrung. Dargestellt ist die Diabeteshäufigkeit in Prozent in weiblichen NOD Mäusen in Abhängigkeit einer im Glutengehalt modifizierten Versuchsnahrung. Die Mäuse wurden in 4 Gruppen eingeteilt. Gruppe 2 D erhielt lebenslang die glutenhaltige Standardnahrung (Kontrollgruppe). Die Gruppe 2 A, 1B, 1C erhielt ab der 3. Lebenswoche die glutenfreie Versuchsnahrung (Glutenfrei-Gruppe). Der dunkel schraffierte Balkenanteil zeigt die Anzahl der Tiere, die an Diabetes erkrankt sind. Der hell schraffierte Balkenanteil stellt die Anzahl der nicht diabetischen Tiere da.

6.2.2 Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung auf die Insulitishäufigkeit bei der NOD Maus

Unabhängig davon für welchen Zeitraum den Tieren das glutenfreie Futter angeboten wurde, konnten durch eine glutenfreie Ernährung der NOD Mäuse signifikant geringere Insulitisgrade der Langerhans'schen Inseln erzielt werden ($p = 0,015$).

54,3 % (25/46) der glutenfrei ernährten NOD-Mäuse (Gruppe 2 A, B, C) zeigten einen Insulitisgrad von 0 (keine lymphozytäre Infiltration der Inseln) oder 1 (nur periinsuläre Infiltrate) im Vergleich zu 22,7% (5/22) aus der Kontrollgruppe (Gruppe 2 D). 77,3% der NOD Mäuse, die lebenslang die glutenhaltige Standardnahrung erhalten hatten, zeigten einen Insulitisgrad von 2 (intrainsuläre lymphozytäre Infiltration bis 50% der Inselfläche) oder 3 (intrainsuläre lymphozytäre Infiltration > 50% der Inselfläche) im Vergleich zu 45,7% der glutenfrei ernährten NOD Mäuse (Abb.5.)

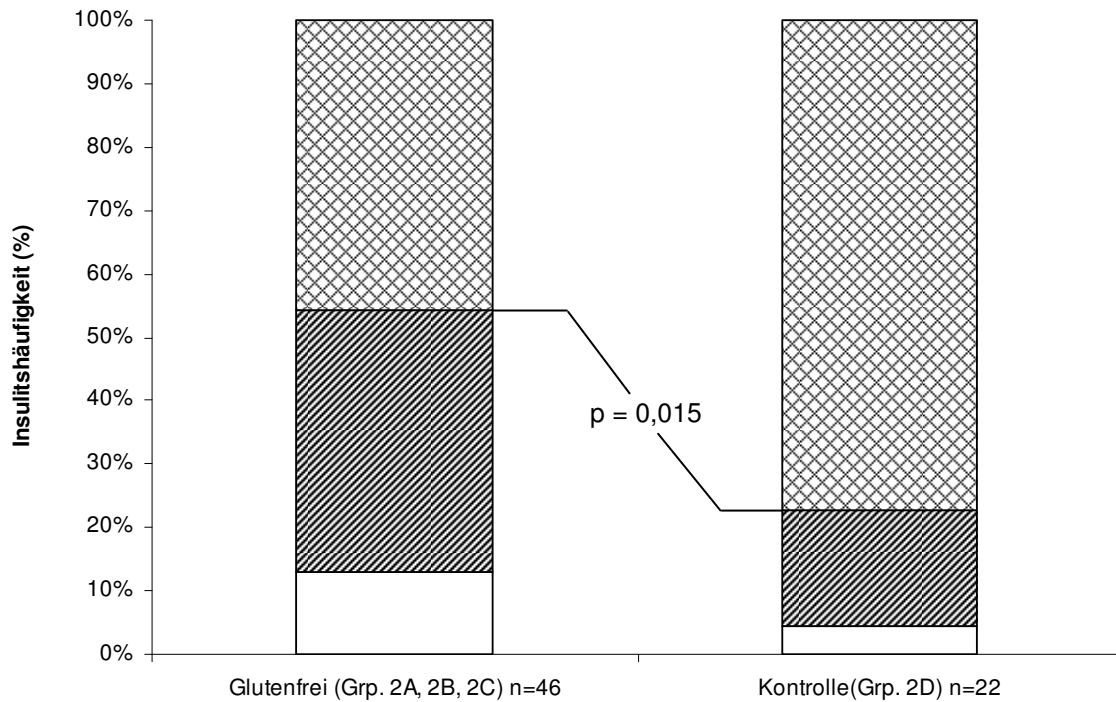


Abb. 5: Insulitishäufigkeit weiblicher NOD Mäuse unter dem Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung. Dargestellt ist die Insulitishäufigkeit in Prozent in weiblichen NOD Mäusen unter dem Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Versuchsnahrung. Die Mäuse wurden in 4 Gruppen eingeteilt. Gruppe 2 D erhielt lebenslang die glutenhaltige Standardnahrung (Kontrollgruppe). Die Gruppen 2 A, 2B, 2C erhielten ab der 3. Lebenswoche die glutenfreie Versuchsnahrung (Glutenfrei-Gruppe). Der weiße Balkenanteil stellt die Anzahl der Tiere mit einem Infiltrationsgrad von 0 dar. Der diagonal schraffierte Balkenanteil zeigt die Anzahl der Tiere mit einem Infiltrationsgrad von 1. Der karierte Balkenanteil stellt die Anzahl der Tiere mit einem Infiltrationsgrad von 2 und 3 dar.

6.2.3 Kumulative Diabetesinzidenz in Abhängigkeit zum Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln der NOD Mäuse unter dem Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung.

Nur 40% (10/25) der glutenfrei ernährten Mäuse mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 entwickelten Diabetes bis zum Alter von 36 Lebenswochen. Die Diabeteshäufigkeit liegt dagegen bei 80% (4/5) bei den mit der glutenthaltigen Versuchsnahrung ernährten NOD Mäusen ($p = 0,02$) und einem Insulitisgrad von 0 und 1. Bei den glutenfrei ernährten NOD Mäusen mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 entwickelten 47,6% (11/21) einen Diabetes im Vergleich zu 82,4% (14/17) aus der Kontrollgruppe ($p = 0,003$). Die glutenfrei ernährten NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 entwickelten zudem später Diabetes als die NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad von 2 und 3, welche glutenthaltige Standardnahrung angeboten bekamen (19 versus 11 Lebenswochen). Bei den glutenfrei ernährten NOD Mäusen mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 konnte ab der 20. Lebenswoche eine Diabetesmanifestation beobachtet werden. Im Vergleich dazu entwickelten die NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad von 0 und 1, welche die glutenthaltige Standardnahrung erhielten, bereits ab der 18. Lebenswoche Diabetes. (Abb.6).

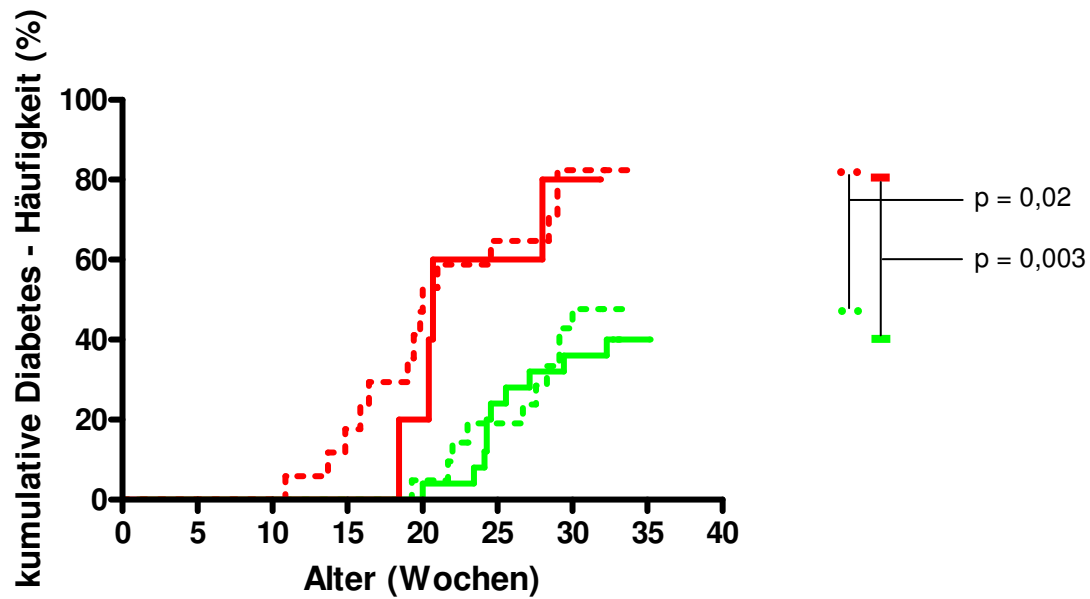


Abb. 6: Kumulatives Diabetesrisiko weiblicher NOD Mäuse in Abhängigkeit ihres Insulitisgrades und des Glutengehaltes ihrer Nahrung. Die grün durchgezogene Linie repräsentiert die glutenfrei ernährten Mäuse mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 (26/46), die grün gestrichelte Linie die glutenfrei ernährten Mäuse mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 (20/46). Die rote Linie repräsentiert die NOD Mäuse der Kontrollgruppe mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 (5/22), die rot gestrichelte Linie die NOD Mäuse der Kontrollgruppe mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 (17/22).

6.2.4 Einfluss einer bezüglich des Glutengehaltes modifizierten Nahrung auf die Diabetesmanifestation bei weiblichen NOD-Mäusen bis zu einem Lebensalter von 12 Wochen

Um den Verlauf der Insulitisentwicklung bei der NOD Maus unter der im Glutengehalt modifizierten Nahrung besser vergleichen zu können, wurden zwei weitere Versuchsgruppen geführt und die Mäuse in einen einheitlichen Alter von 12 Wochen untersucht. Dabei erhielt Gruppe 3A glutenfreies Futter, während die Tiere der Gruppe 3B Standardnahrung angeboten bekamen.

Bei einem Lebensalter von 12 Wochen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Diabetesmanifestation der glutenfrei ernährten Mäuse und den Kontrolltieren beobachtet werden ($p = 1,00$). Lediglich ein Tier (1/7) aus der Kontrollgruppe hatte mit 12 Wochen bereits Diabetes entwickelt (14,3%). Keines der glutenfrei ernährten Tiere hatte mit 12 Wochen Autoimmundiabetes entwickelt (Abb. 7).

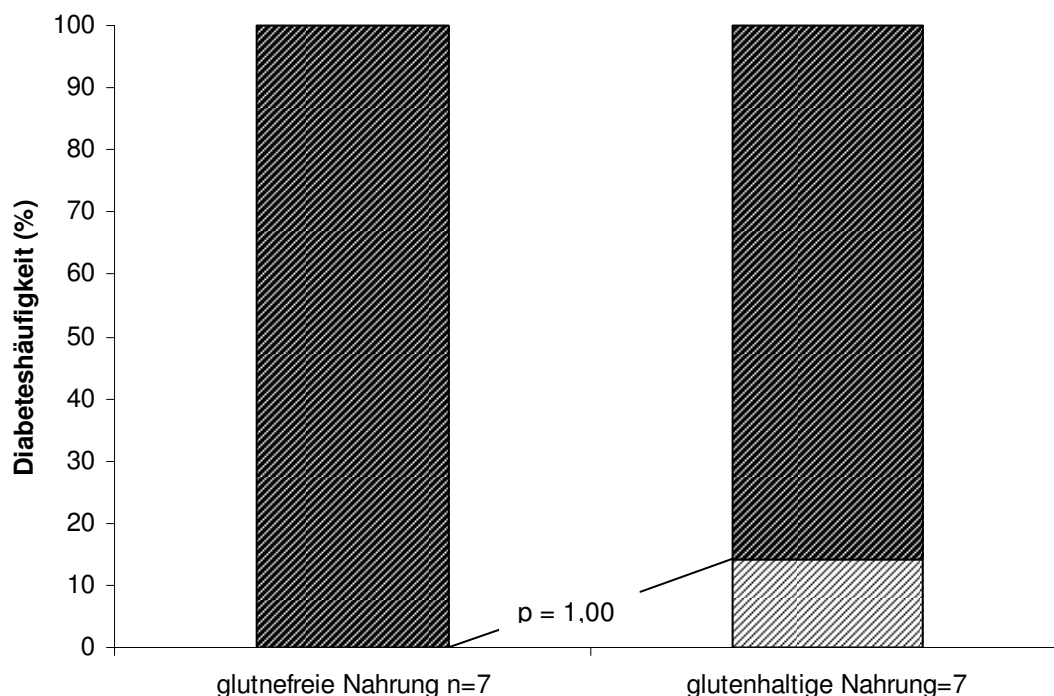


Abb. 7: Diabeteshäufigkeit weiblicher NOD Mäuse im Alter von 12 Wochen in Bezug auf eine im Glutengehalt modifizierte Nahrung. Der dunkel schraffierte Balkenanteil zeigt die Anzahl der Tiere, die an Diabetes erkrankt sind. Der hell schraffierte Balkenanteil stellt die Anzahl der nicht diabetischen Tiere da.

6.2.5 Einfluss einer bezüglich des Glutengehaltes modifizierten Nahrung auf die Insulitishäufigkeit bei der NOD Maus bei einem Lebensalter von 12 Wochen

Bei einem einheitlichen Lebensalter von 12 Wochen fiel bei den glutenfrei ernährten NOD Mäusen und den mit der glutenthaltigen Standardnahrung ernährten Tiere hinsichtlich des Infiltrationsgrades der Langerhans'schen Inseln kein signifikanter Unterschied auf ($p = 0,107$).

Graphisch lässt sich aber zeigen, dass in der glutenfrei ernährten Gruppe deutlich mehr Tiere (71,4%; 5/7) einen Insulitisgrad von 1 hatten im Vergleich zu den Tieren aus der Kontrollgruppe (28,6%; 2/7). 57,1% (4/7) der Mäuse aus der Kontrollgruppe zeigten hochgradige Infiltrationen des Grades 2 und 3, dagegen nur 14,3 % (1/7) der glutenfrei ernährten Tiere (Abb. 8).

Auffällig war zudem, dass bei den glutenfrei ernährten Mäusen deutlich mehr Inseln im exocrinen Pankreas zu finden waren, als bei den mit der Standardnahrung ernährten Mäusen. Zwischen 16 und 31 Inseln konnten bei den glutenfrei ernährten Mäusen ausgewertet werden, dagegen nur zwischen 5 und 14 Inseln bei den Mäusen der Kontrollgruppe. Dies deutet darauf hin, dass unter einer glutenfreien Ernährung die Langerhans'schen Inseln des Pankreas länger ungeschädigt sind.

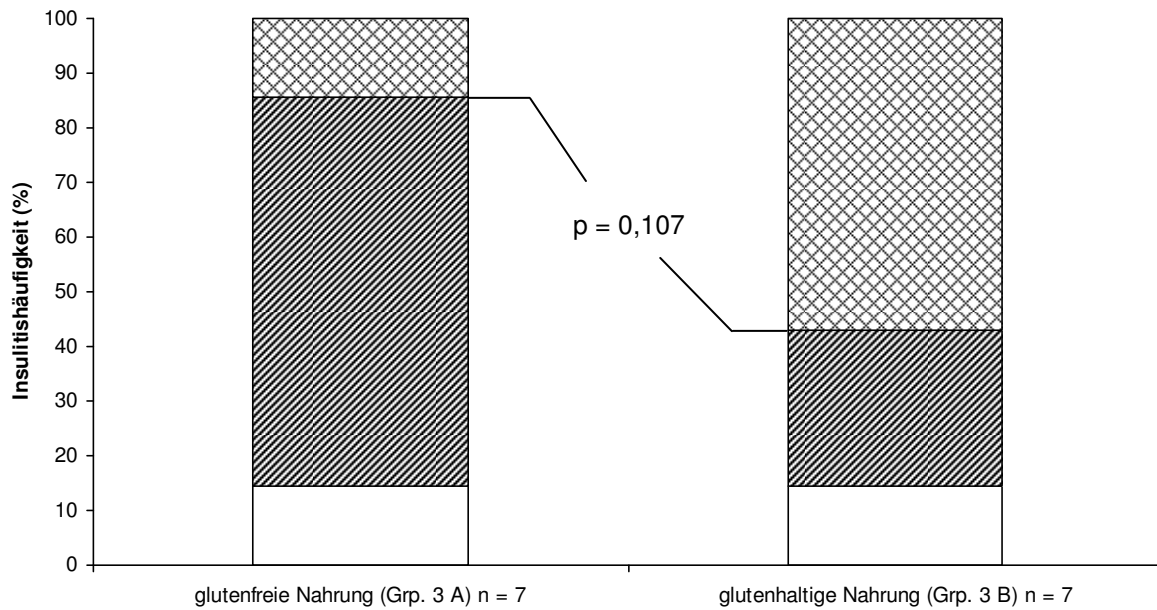


Abb. 8: Insulitishäufigkeit weiblicher NOD Mäuse unter dem Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung bei einem Lebensalter von 12 Wochen.

Die Mäuse wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Gruppe 3 A erhielt die glutenfreie Versuchsnahrung, Gruppe 3 B die Standardnahrung. Der weiße Balkenanteil stellt die Anzahl der Tiere mit einem Insulitisgrad von 0 dar. Der diagonal schraffierte Balkenanteil zeigt die Anzahl der Tiere mit einem Insulitisgrad von 1. Der karierte Balkenanteil stellt die Anzahl der Tiere mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 dar.

6.3. Einfluss eines Histamin 1 und 2 Rezeptorblockers auf die diabetes-assoziierte Autoimmunität

In diesem Untersuchungsteil sollte geprüft werden, ob eine Therapie mit Histamin -1- Rezeptor (H1R)-, bzw. Histamin-2- (H2R)-Antagonisten bei weiblichen NOD Mäusen einen Einfluss auf den Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln des Pankreas und die Diabetesentwicklung hat. Verglichen wurden die Pankreata von 9 Mäusen, denen der H1R-Antagonist Doxylamin (Gruppe 4A), 9 Mäusen, denen der H2R-Antagonist Ranitidin (Gruppe 4B) zugeführt wurde, mit 8 Mäusen, die ausschließlich die Diphtherie-Tetanus (DT)-Vakkzinierung (Gruppe 4C) erhalten hatten, und 8 unbehandelten Mäusen (Gruppe 4D; Kontrolle).

6.3.1 Insulitishäufigkeit der oral mit Histamin 1 Rezeptor- und Histamin 2 Rezeptorantagonisten behandelten NOD Mäuse

Um neben den autoimmunen Insulinautoantikörpern einen zusätzlichen Marker für die Analyse der Immunantwort nach Histamin-Rezeptorblockierung zu induzieren, wurden die NOD Mäuse der Gruppen 4A, 4B und 4C mit zehn und vierzehn Lebenswochen mit einem Diphtherie-Tetanus-Toxoid (DT) subkutan immunisiert. Die Tiere der Gruppe 4D erhielten keine DT-Immunisierung. Um den Einfluss einer Immunisierung mit DT auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Typ 1 Diabetes bei der NOD Maus zu untersuchen, wurden zunächst die beiden Untersuchungsgruppen 4C (nur DT immunisiert) und Gruppe 4D (unbehandelt) analysiert. Sowohl alle NOD Tiere (100%), die nur den DT-Impfstoff verabreicht bekamen, als auch alle unbehandelten NOD Mäuse (100%) entwickelten Diabetes. Auch im Hinblick auf den Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. 75 % der DT immunisierten NOD Mäuse zeigten einen Insulitisgrad von 2 im Vergleich zu 87% der unbehandelten Tiere. Lediglich 2 Tiere, welche die DT-Vakkzinierung erhielten, hatten einen Insulitisgrad von 1 (25,0%). Nur ein unbehandeltes Tier (12,5%) zeigte eine massive lymphozytäre Infiltration der Langerhans'schen Inseln (Ergebnisse graphisch nicht dargestellt).

Die Analysen der Insulitisgrade bestätigen die Annahme, dass eine Immunisierung mit dem Impfstoff DT keinen Einfluss auf die Diabetesentwicklung hat. Da bei den beiden Gruppen kein Unterschied im Hinblick auf die Insulitisentwicklung

nachweisbar ist, werden die beiden Gruppen für den Vergleich mit den Interventionsgruppen 4A und 4B als eine Kontrollgruppe zusammengefasst. Der Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln war bei den NOD Mäusen, die mit dem H1R- bzw. H2R-Antagonisten behandelt wurden (Gruppe 4 A; n=9 und 4 B; n=9), signifikant niedriger ($p = 0,006$; $p = 0,024$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 16). Bei keinem der untersuchten Tiere konnte ein Insulitisgrad von 0 ausgewertet werden. Eine periinsuläre Infiltration von Immunzellen (Insulitisgrad 1) konnte in 66,7% (6/9) der Tiere mit dem H1R-Antagonisten, in 33,3% (3/9) der Tiere mit dem H2R-Antagonisten und in 12,5% (2/16) der unbehandelten Kontrollgruppe gefunden werden. Ein Insulitisgrad von 2 (lymphozytäre Infiltration bis zu 50%) konnte in 33,3% (3/9) der Tiere der Gruppe 4 A, in 67% (6/9) der Tiere der Gruppe 4 B und in 81,3% (13/16) bei der Kontrollgruppe bestimmt werden. Nur eine NOD Maus aus der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte eine massive lymphozytäre Infiltrationen über 50% der Inselfläche der Langerhans'schen Inseln (Insulitisgrad 3) (Abb. 9)

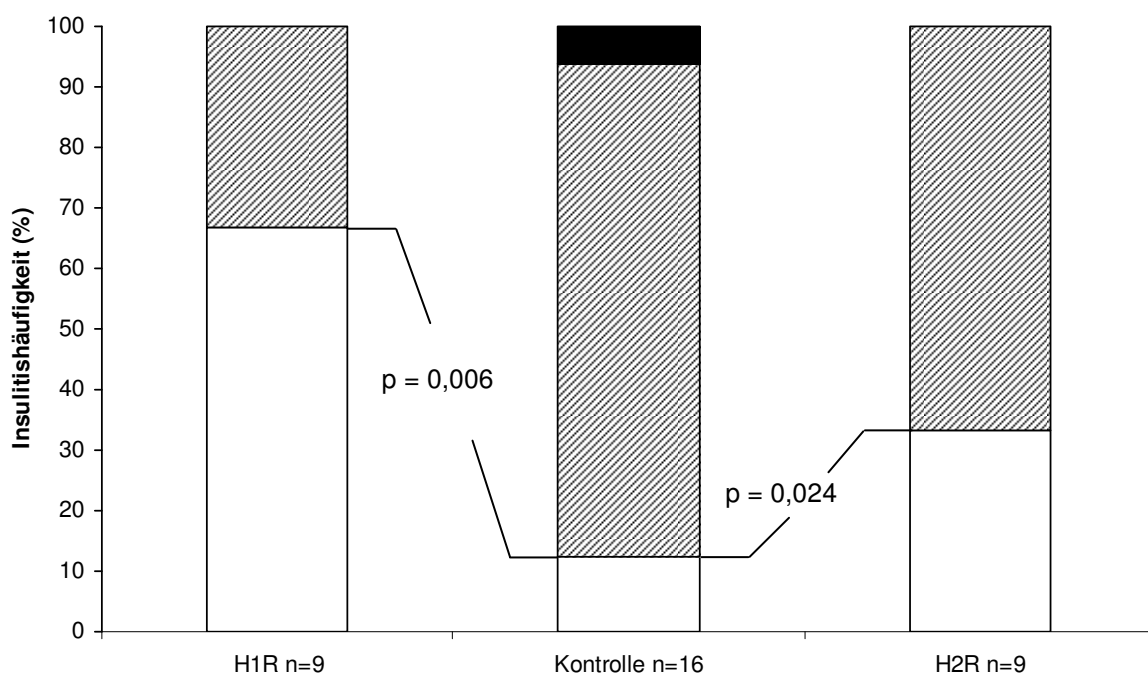


Abb. 9: Insulitishäufigkeit weiblicher NOD Mäuse nach der Zufuhr von H1R- und H2R-Antagonisten über das Trinkwasser. Gruppe 4A erhielt den H1R-Antagonisten (n=9), Gruppe 4B den H2R-Antagonisten (n=9). Die Mäuse der Gruppe 4C und 4D (n=16) erhielten keine Behandlung und bilden die Kontrollgruppe. Der weiße Balkenanteil repräsentiert die Tiere mit einem Insulitisgrad von 1 (Periinsulitis), der diagonal schraffierte Balkenanteil die mit einem Insulitisgrad von 2 (lymphozytäre Infiltration bis 50%) und der schwarze Balkenanteil zeigt die eine Maus mit einem Insulitisgrad von 3 (lymphozytäre Infiltration >50%).

6.3.2 Diabetesinzidenz der oral mit Histamin 1 Rezeptor- und Histamin 2 Rezeptorantagonisten behandelten NOD Mäuse

Die Diabetesentwicklung bei NOD Mäusen konnte durch eine Therapie mit H1R-Antagonisten signifikant reduziert werden. Sie liegt bei 55,6% gegenüber 100% in der unbehandelten Kontrollgruppe ($p = 0,002$). Eine Therapie mit H2R-Antagonisten führte hingegen zu keiner signifikanten Reduktion der Diabeteshäufigkeit (77,8% und 100%, $p = 0,12$) (Abb. 10).

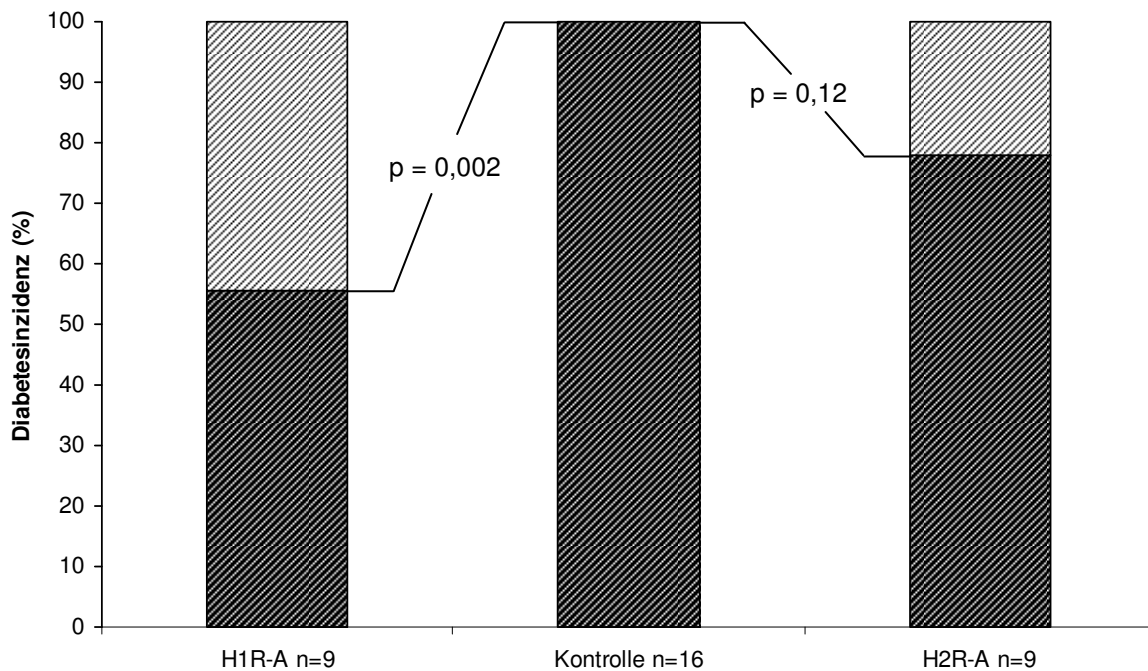


Abb. 10: Diabetesinzidenz der weiblichen NOD Mäuse nach der Zufuhr von H1R- und H2R-Antagonisten über das Trinkwasser. Gruppe 4A erhielt den H1R- Antagonist Doxylamin, Gruppe 4B den H2R- Antagonisten Ranitidin, Gruppe 4C und 4D wurde als unbehandelte Kontrollgruppe geführt. Der dunkel schraffierte Balkenanteil zeigt die Anzahl der Tiere, die an Diabetes erkrankt sind. Der hell schraffierte Balkenanteil stellt die Anzahl der nicht diabetischen Tiere da.

6.3.3 Diabetesinzidenz in Relation zur Insulitis der oral mit Histamin 1 Rezeptor- und Histamin 2 Rezeptorantagonisten behandelten NOD Mäuse

33,3% (2/6) der Mäuse, die täglich mit 10 mg des H1R-Antagonisten Doxylamin behandelt wurden und einen Insulitisgrad von 0 und 1 hatten, entwickelten bis zu einem Alter von 32 Lebenswochen Diabetes. Die Diabeteshäufigkeiten lagen dagegen bei 80% (4/5) bei den Tieren, die täglich 10 mg des H2R-Antagonisten erhielten, und bei 100% der Tiere aus der Kontrollgruppe. Lediglich die Diabetesinzidenz bei den mit dem H1R-Antagonisten behandelten NOD Mäusen war im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren signifikant verringert ($p = 0,03$). Die Analysen der Diabetesinzidenz in Abhängigkeit des Infiltrationsgrades bei den Interventionsgruppen mit einem Infiltrationsgrad von 2 und 3 zeigten keine signifikanten Unterschiede. 75% (3/4) der mit dem H2R-Antagonisten behandelten NOD Tiere mit einem Infiltrationsgrad von 2 und 3 und 100 % (14/14) der Tiere aus der Kontrollgruppe entwickelten Diabetes. Dagegen beträgt die Diabeteshäufigkeit bei den mit dem H1R-Antagonisten behandelten Mäusen mit einem Infiltrationsgrad von 2 und 3 66,6% (2/3).

Zudem konnte eine spätere Diabetesentwicklung bei den mit dem H1R-Antagonisten behandelten NOD Mäusen mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 im Vergleich zu den mit dem H2R-Antagonisten behandelten NOD Mäusen und den Tieren der Kontrollgruppe mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 (24 versus 14 und 22) (Abb.11).

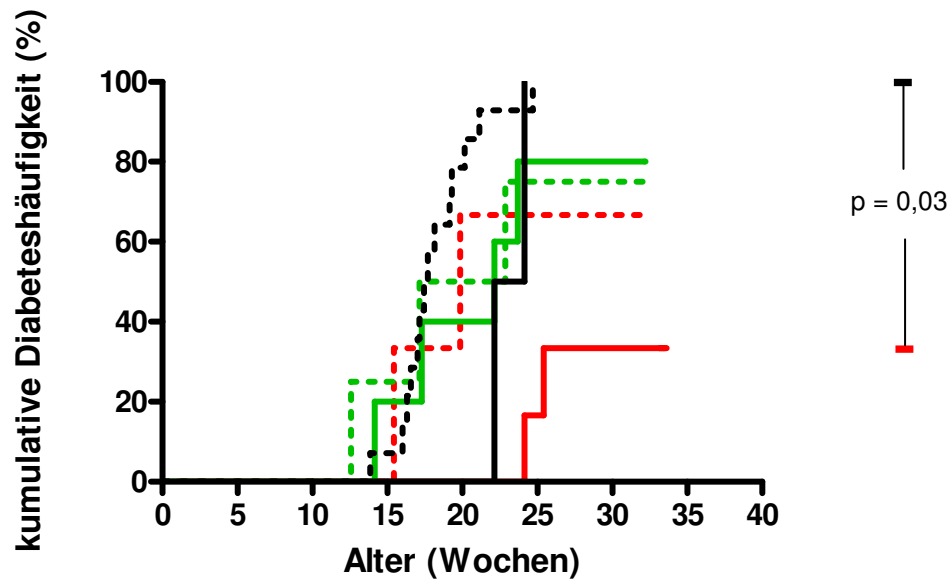


Abb. 11: Kumulatives Diabetesrisiko weiblicher NOD Mäuse in Abhängigkeit ihres Infiltrationsgrades der Langerhans'schen Inseln und der Behandlung mit H1R- bzw. H2R-Antagonisten. Die rot durchgezogene Linie repräsentiert die mit dem H1-R-Antagonisten behandelten NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 (6/9), die rot gestrichelte Linie die NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 (3/9). Die grün durchgezogene Linie repräsentiert die mit dem H2-R-Antagonisten therapierten NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 (5/9), die grün gestrichelte Linie, die NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 (4/9). Die schwarz durchgezogene Linie zeigt die unbehandelten Mäuse mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 (2/16), und die schwarz gestrichelte Linie, die unbehandelten NOD Mäuse mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 (14/16).

6.4 Einfluss einer Immunisierung mit diabetesassoziierten Antigenen auf die Diabetesentwicklung und die diabetesassoziierte Autoimmunität

Der Manifestation des Typ 1 Diabetes geht bei der genetisch unveränderten NOD Maus die Infiltration von Immunzellen in die Langerhans'schen Inseln des Pankreas voraus. Durch Immunisierungen bzw. orale Verabreichungen des diabetesassoziierten Antigens Insulin konnte bereits im NOD Maus Modell die Diabetesentwicklung signifikant verringert werden.

In diesem Studienteil sollte untersucht werden, ob sich eine Immunisierung weiblicher NOD Mäuse mit Insulin im Vergleich zu anderen diabetesassoziierten Antigenen nur auf die Diabetesentwicklung auswirkt oder auch die Insulitisentwicklung dadurch inhibiert werden kann. Diesbezüglich wurden von den untersuchten Tieren histologische Untersuchungen durchgeführt. Verglichen wurden die Pankreata von 4 mit Insulin immunisierten Mäusen mit den Pankreata von 4 mit GAD, 4 mit Glucagon, 6 mit PNMT und 5 mit IA-2 β immunisierten Mäusen.

6.4.1 Diabetesinzidenz weiblicher NOD Mäuse immunisiert mit diabetes-assoziierten Antigenen

Aufgrund der geringen Anzahl der Versuchstiere zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Diabetesmanifestation bei den mit Insulin immunisierten Tieren im Vergleich zu den NOD Mäusen, die mit GAD, Glucagon, PNMT und IA 2 β geimpft wurden ($p = 0,28$). Graphisch zeigt sich aber, dass die mit Insulin immunisierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Diabetes entwickelten (25% und 63%) (Abb. 12).

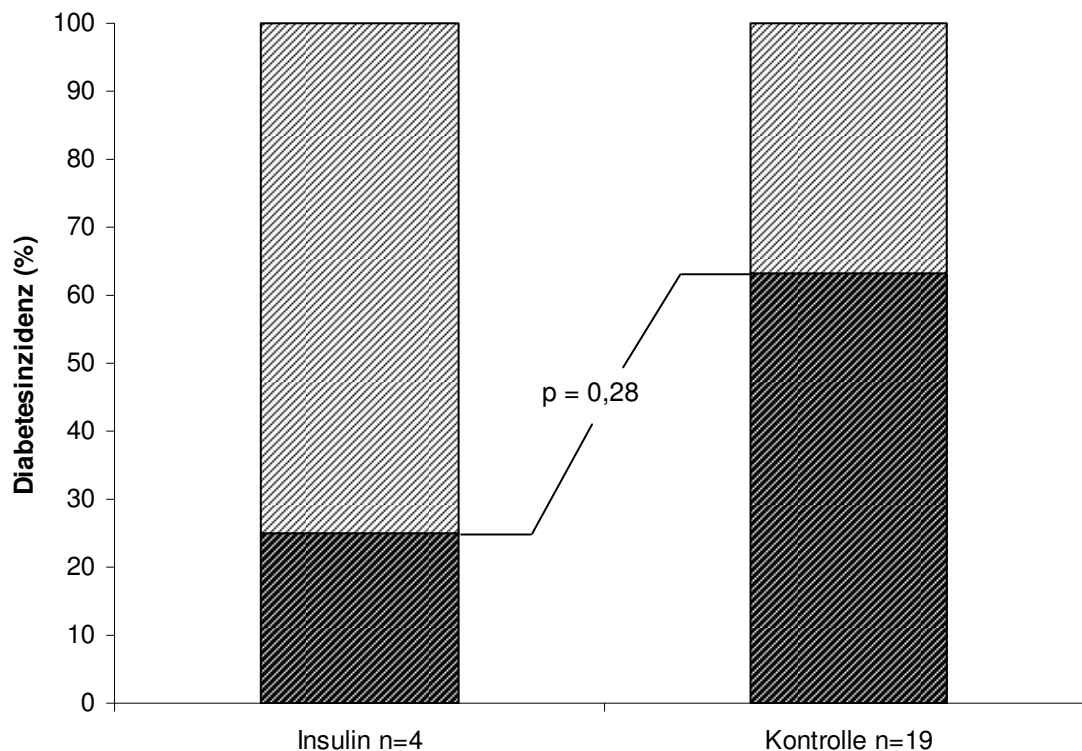


Abb. 12: Diabetesinzidenz der weiblichen NOD Mäuse nach der Immunisierung mit diabetesassoziierten Antigenen. Die Gruppen 5A (GAD, n= 4), 5B (Glucagon, n=4), 5D (PNMT, n=6) und 5E (IA 2 β , N=5) wurden als Kontrollgruppe zusammengekommen und mit den mit Insulin immunisierten Mäusen (Gruppe 5C, n=4) verglichen. Der dunkel schraffierte Balkenanteil zeigt die Anzahl der Tiere, die an Diabetes erkrankt sind. Der hell schraffierte Balkenanteil stellt die Anzahl der nicht diabetischen Tiere dar.

6.4.2 Insulitis weiblicher NOD Mäuse immunisiert mit diabetesassoziierten Antigenen

Aufgrund der geringen Anzahl der Versuchstiere zeigt sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Insulitisentwicklung bei den mit Insulin immunisierten Tieren im Vergleich zu den NOD Mäusen, die mit GAD, Glucagon, PNMT und IA 2 β geimpft wurden ($p = 0,116$). Graphisch zeigt sich aber (Abb. 13), dass 50% der Mäuse, die mit Insulin immunisiert wurden, einen Insulitisgrad von 0 bzw. 1 hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe (26,3%). Kein Insulin geimpftes Tier zeigte einen Infiltrationsgrad von 2 (lymphozytäre Infiltration bis 50% der Inselfläche), dagegen 47,4% aus der Kontrollgruppe. Eine massive Infiltration der Langerhans'schen Inseln (lymphozytäre Infiltration >50% der Inselfläche, Insulitisgrad 3) wurde bei keinem der untersuchten Tiere gefunden.

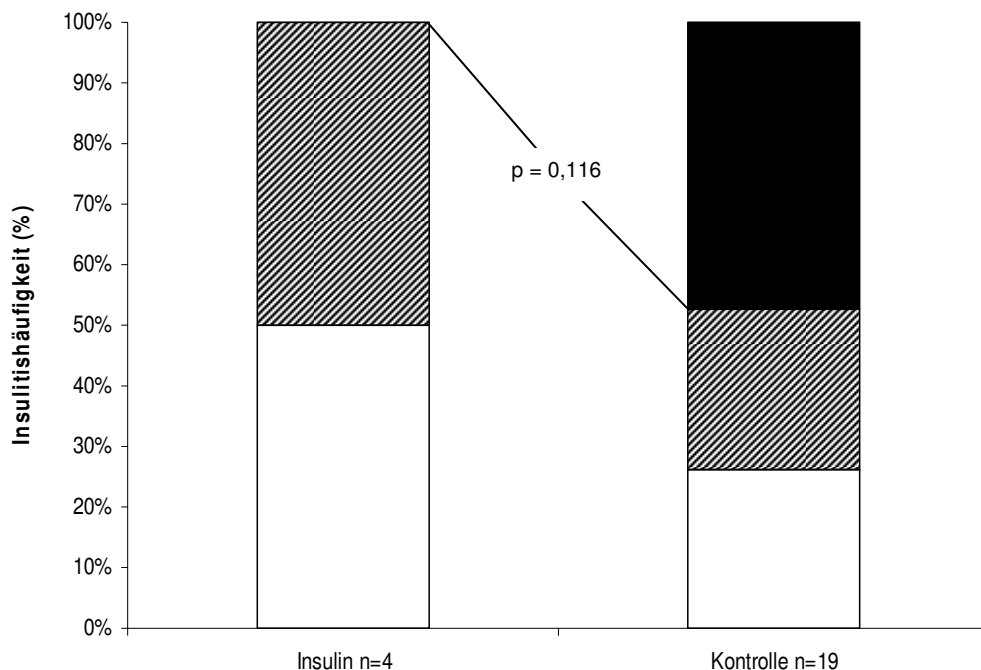


Abb. 13: Insulitishäufigkeit weiblicher NOD Mäuse nach der Immunisierung mit diabetesassoziierten Antigenen. Dargestellt ist die Insulitishäufigkeit in Prozent der einzelnen Untersuchungsgruppen. Der weiße Balkenanteil repräsentiert die Tiere mit einem Insulitisgrad von 0, der diagonal schraffierte Balkenanteil die mit einem Insulitisgrad von 1, der schwarze Balkenanteil die mit einem Insulitisgrad von 2.

7. Diskussion

7.1. Einfluss des Geschlechts auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell

Die non obese diabetic (NOD) Maus ist ein Tiermodell, welches spontan klinische Symptome eines Typ 1 Diabetes zeigt. Die spontane Diabetesentwicklung ist der beim Menschen ähnlich. So sind auch bei NOD Mäusen noch vor Diabetesmanifestation Insulinautoantikörper detektierbar und auch eine für den humanen Typ 1 Diabetes typische Insulitis ist nachweisbar (2,72,119). Bei den meisten NOD Mäusen beginnt die Zerstörung der pankreatischen Inseln kurz nach der Geburt (36). Eine Infiltration von mononukleären Leukozyten in die Langerhans'schen Inseln des Pankreas ist bei allen NOD Mäusen ab der vierten bis sechsten Lebenswoche zu beobachten. Die Diabetesentwicklung ist dagegen stark geschlechtsspezifisch (60). So beträgt die kumulative Diabetesinzidenz bis zur dreißigsten Lebenswoche bei den weiblichen NOD Mäusen 80%, dagegen nur 10% bei den männlichen Tieren (72). Durch eine zum humanen Typ 1 Diabetes ähnlich verlaufende Pathogenese stellen NOD Mäuse ein exzellentes Tiermodell für Studien des Immungeschehens im Autoimmundiabetes dar. So sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob auch bei den NOD Mäusen des Institutes für Diabetesforschung in München-Schwabing ein geschlechtsspezifischer Unterschied bezüglich Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes besteht. Dazu wurden achtzehn weibliche und zweiundzwanzig männliche unbehandelte NOD Mäuse untersucht.

Wie erwartet zeigten männliche NOD Mäuse eine signifikant geringere Diabetesinzidenz verglichen zu den weiblichen Tieren (4,4% versus 77,8%). Zudem konnte unter den männlichen Tieren eine signifikant geringere Ausprägung der Insulitis gezeigt werden. Bei 36,4% der männlichen Tiere konnte ein Insulitisgrad von 0 (keine lymphozytäre Infiltration der Langerhans'schen Inseln) und bei 50 % ein Insulitisgrad von 1 (periinsuläre Infiltration) ausgewertet werden. Dagegen hatten nur 11,1% der weiblichen Tiere einen Insulitisgrad von 0 und 55,6% einen Insulitisgrad von 1. Eine mittelgradige Insulitis (lymphozytäre Infiltration bis 50% der Inselfläche; Insulitisgrad von 2) konnte bei 33,6% der weiblichen NOD Mäuse analysiert werden, dagegen nur bei 13,6% der männlichen Tiere. Weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Tieren konnte eine schwerwiegende Insulitis (lymphozytäre Infiltration > 50% der

Insellfläche; Insulitisgrad 3) beobachtet werden. Zudem war das kumulative Diabetesrisiko bei den männlichen NOD Mäusen mit einem Insulitisgrad von 0 bzw. 1 bei einem Beobachtungszeitraum von 36 Wochen signifikant geringer im Vergleich zu den weiblichen Tieren mit solch einer geringgradigen Insulitis. Dieses betrug bei den männlichen NOD Mäusen 5%. Im Vergleich dazu betrug das kumulative Diabetesrisiko bei den weiblichen Tieren 82%.

Die Ergebnisse der zugrunde liegenden Arbeit entsprechen den bestehenden Vorbefunden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Mäusezucht am Institut für Diabetesforschung in München Schwabing ein exzellentes Tiermodell für die durchgeführten Interventionsversuche zum besseren Verständnis der Immunpathogenese des Typ 1 Diabetes darstellt. Da die männlichen NOD Mäuse eine geringgradige Insulitis ausbilden, wurden für die durchgeführten Versuche zur Darstellung der Insulitisentwicklung und Diabetesmanifestation unter verschiedenen Therapieansätzen lediglich weibliche NOD Mäuse untersucht.

7.2. Einfluss einer im Glutengehalt modifizierten Nahrung auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell

Nahrungsmodifikationen können die Diabetesinzidenz verändern (101). Die in klinischen Studien am häufigsten eingesetzte Nahrungsmodifikation ist die Elimination des Weizenproteins Gluten aus der Nahrung. Gluten ist als Auslöser der Autoimmunerkrankung Zöliakie bereits eindeutig identifiziert worden und eine glutenfreie Ernährung dieser Patienten stellt die grundlegende Therapie dar.

Aufgrund zahlreicher epidemiologischer Untersuchungsergebnisse (17,25,31,37,64,114,115) wird seit einigen Jahren diskutiert, dass Gluten auch in der Pathogenese des Autoimmundiabetes eine Rolle spielt. So sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob durch eine glutenfreie Nahrung der Prozess der Inselentzündung inhibiert und folglich der Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell verhindert werden kann.

Dazu wurden Organschnitte weiblicher NOD-Mäuse im Hinblick auf den Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln histologisch untersucht.

Durch eine glutenfreie Ernährung der Tiere konnte eine signifikant geringere Ausprägung der Insulitis erzielt werden. Dabei spielt es keine Rolle ob den Mäusen lebenslang oder nur für einen bestimmten Zeitraum die glutenfrei Nahrung angeboten wurde. 54,3% der glutenfrei ernährten NOD-Mäuse zeigten einen

Insulitisgrad von 0 (keine lymphozytäre Infiltration) oder lediglich 1 (periinsuläre Infiltrate) im Vergleich zu 22,7% der Tiere aus der Kontrollgruppe, welche glutenhaltiges Standardfutter erhielten. 45,7% der glutenfrei ernährten NOD Mäuse zeigten einen Insulitisgrad von 2 (intrainsuläre lymphozytäre Infiltration bis 50% der Inselfläche) oder 3 (lymphozytäre Infiltration > 50% der Inselfläche) im Vergleich zu 77,3% der Kontrollgruppe. Zudem konnte durch die glutenfreie Ernährung der Tiere eine hoch signifikante Verringerung der Diabetesinzidenz erzielt werden. Nur 43,5% der glutenfrei ernährten NOD Mäuse entwickelten Diabetes. Dagegen betrug die Diabeteshäufigkeit in der Kontrollgruppe 81,8%. Ferner konnte durch eine glutenfreie Ernährung der Tiere das kumulative Diabetesrisiko in Abhängigkeit zum Infiltrationsgrad der Langerhans'schen Inseln signifikant verringert werden. Dieses betrug bei den glutenfrei ernährten Tieren mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 während einer Beobachtungszeit von 36 Wochen 40%. Im Vergleich dazu betrug das kumulative Diabetes-Risiko bei den Tieren mit einem Insulitisgrad von 0 und 1, welche glutenhaltiges Futter erhielten, 80%. Das kumulative Diabetes-Risiko bei den glutenfrei ernährten Tieren mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 betrug 47,6%, im Vergleich zu 82,4% bei den Tieren, welche glutenhaltiges Futter erhielten. Auch Funda (1999) konnte in seinem Tierexperiment durch eine lebenslange glutenfreie Ernährung der NOD Mäuse eine signifikante Verringerung der Diabetesinzidenz (15%) erreichen (37). Auch Studien unserer Arbeitsgruppe erreichten bei NOD Weibchen, die lebenslang bzw. im Zeitraum nach der Entwöhnung (vierte bis zehnte Lebenswoche) glutenfrei ernährt wurden, verringerte Diabetesinzidenzen (51% und 36%). Diese gingen mit verringerten Insulinautoantikörper-Prävalenzen einher, was für eine durch glutenfreie Nahrung induzierte Veränderung der diabetesassoziierten Autoimmunität spricht (97). Ebenso zeigten Untersuchungen bei Kindern ein signifikant höheres Risiko, Inselautoantikörper zu entwickeln, wenn diese bereits sehr früh im Säuglingsalter (vor dem 3 Lebensmonat) mit glutenhaltiger Nahrung ernährt wurden (122). Andererseits konnte durch eine glutenfreie Ernährung von Kindern, die bereits Inselautoantikörper entwickelt hatten, keine Verringerung der Autoantikörpertiter erreicht werden (48).

Um den Verlauf der Insulitisentwicklung unter der im Glutengehalt veränderten Nahrung besser vergleichen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere Versuchgruppen geführt und weibliche NOD Mäuse in einem einheitlichen

Alter von 12 Wochen untersucht. Dabei erhielten die Mäuse der einen Gruppe glutenfreies Futter, während die andere Gruppe glutenthaltiges Standardfutter angeboten bekam. Sowohl bei der Insulitisentwicklung als auch der Diabetesmanifestation konnten hinsichtlich der Nahrungsmodifikation keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Dennoch konnten bei den glutenfrei ernährten Tieren deutlich mehr Inseln mit einem Insulitisgrad von 1 (71,4%) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (28,6%) ausgewertet werden. Ein Insulitisgrad von 2 und 3 konnte in 14,3% der glutenfrei ernährten Tiere bestimmt werden, im Vergleich zu 57,1% der Kontrollgruppe. Auffällig war zudem, dass bei den glutenfrei ernährten Mäusen deutlich mehr Inseln im exokrinen Pankreas zu finden waren als bei den Tieren, die Standardnahrung angeboten bekamen. Zwischen 16 und 31 Inseln konnten bei den glutenfrei ernährten Mäusen ausgewertet werden. Dagegen konnten bei den Tieren der Kontrollgruppe nur zwischen 5 und 14 Inseln analysiert werden. Dies deutet darauf hin, dass unter der glutenfreien Nahrung die Langerhans'schen Inseln des Pankreas länger ungeschädigt bleiben. Diese Beobachtung unterstreicht das Ergebnis einer Studie junger Erwachsener mit Inselautoantikörpern, deren Insulinausschüttung nach intravenöser Glucosezufuhr durch eine glutenfreie Ernährung verbessert werden konnte (87). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine glutenfreie Ernährung einen protektiven Effekt auf die β -Zellfunktion hat.

Neueste Untersuchungen von Funda am NOD Mausmodell konnten den 1999 beschriebenen protektiven Effekt der glutenfreien Nahrung auf die Diabetesinzidenz nicht mehr nachweisen. Sowohl eine glutenfreie Nahrung als auch eine, verglichen zur glutenthaltigen Standardnahrung, im Glutengehalt gesteigerte Nahrung zeigte eine signifikante Verringerung der Diabetesinzidenz. Erstaunlicherweise konnte aber nur durch eine glutenfreie Ernährung der NOD Mäuse die Ausprägung der Insulitis signifikant verringert werden (38).

Der genaue Mechanismus, wie Nahrungsfaktoren die Entwicklung von Autoimmundiabetes beeinflussen, ist bisher unklar. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass der präventive Effekt von Gluten im Hinblick auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes über zwei Wirkungsmechanismen zu erklären ist. Zum einen könnte Gluten die Entwicklung des Typ 1 Diabetes direkt über die Darmschleimhaut beeinflussen oder indirekt über eine Veränderung der physiologischen Darmflora. So berichten neueste Untersuchungen im NOD Modell

über eine Zunahme grampositiver Darmbakterien unter glutenfreier Nahrung (44). Zudem wurde nachgewiesen, dass im NOD Mausmodell nach weizenreicher Nahrung eine Verschiebung des intestinalen Zytokingleichgewichts hin zum Th1-Typ erfolgt. Das lässt eine Veränderung des darmassoziierten Immunsystems als Beitrag zur Diabetesentwicklung vermuten (33). Auch Maurano berichtet über Darmerkrankungen und eine Erhöhung entzündlicher Zytokine der Darmschleimhaut bei NOD Mäusen nach weizenreicher Nahrung (73). Andererseits könnte die Glutenverabreichung direkt oder indirekt zu Veränderungen der pankreatischen β -Zelle führen.

Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass Gluten nicht das treibende Antigen im Typ 1 Diabetes ist. Es scheint aber den Verlauf einer genetisch prädestinierten diabetesassoziierten Autoimmunität zu modulieren, denn unter einer glutenfreien Ernährung konnte die Insulitisentwicklung inhibiert werden. Um den genauen Wirkungsmechanismus des Glutens in der Entstehung des Autoimmundiabetes näher zu charakterisieren sind weitere Untersuchungen am NOD Mausmodell unerlässlich. Vor allem Untersuchungen des Darm-assoziierten Immunsystems sind für die Aufklärung der pathogenetischen Mechanismen sinnvoll.

7.3. Einfluss der oralen Zufuhr von Histamin-1-Rezeptorantagonisten auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes

Eine besondere Bedeutung wird bei der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 der Th1/Th2 Zytokinbalance zugemessen, und es wird davon ausgegangen, dass beim Typ 1 Diabetes die β -Zell Destruktion durch zytotoxische Zellen gegen Autoantigene ausgelöst wird, welche durch Th1-Zytokine reguliert werden (53).

Bei NOD Mäusen, dem klassischen Tiermodell des humanen Typ 1 Diabetes, wurde beobachtet, dass es im Verlauf der Insulitis zum Einwandern von autoreaktiven Zellen in die endokrinen Inseln des Pankreas kommt, wobei hauptsächlich CD4+ und CD8+ T-Zellen das Inselinfiltrat ausmachen (111,112). CD4+ T-Zellen werden anhand ihres Zytokinprofils in Th1 und Th2 Zellen eingeteilt (77). Es wird davon ausgegangen, dass bei der Krankheitsentstehung des Typ 1 Diabetes zunächst eine benigne Th2 gewichtete Insulitis vorliegt, welche nach einer Zytokinverschiebung, vermutlich durch einen exogenen Faktor ausgelöst, in die maligne Th1 mediierte Insulitis übergeht und zum β -Zell-Tod und Insulinmangel führt (61).

In einer Studie an Mäusen mit zerstörten Histamin -1-Rezeptoren wurde über eine verstärkte Produktion des Th2 spezifischen Zytokin IL-4 berichtet. Dagegen zeigten Mäuse mit zerstörten Histamin-2-Rezeptoren sowohl eine verstärkte Sekretion von Th1- als auch von Th2-typischen Zytokinen (55). Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass durch eine Blockade des Histamin 1 Rezeptors die Th2 Immunität gestärkt wird und dadurch eine weniger aktive Krankheitsphase erreicht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte am NOD Mausmodell untersucht werden, ob durch die Verabreichung von Histamin-1-Rezeptorantagonisten über das Trinkwasser eine Verschiebung der Immunantwort weg von der destruktiven Th1 hin zur protektiven Th2 Immunität erreicht werden, und dadurch der Insulitisprozess inhibiert und die Diabetesinzidenz reduziert werden kann.

Bei den oral mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten behandelten NOD Mäusen konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe tatsächlich eine signifikant geringere Ausprägung der Insulitis erreicht werden. Zudem wurde bei den mit dem Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten behandelten Tieren eine signifikante Reduktion der Diabetesinzidenz beobachtet. Die Diabetesinzidenz der mit dem Histamin-1-Rezeptorantagonisten behandelten Mäuse lag bei 55,6% im Vergleich zu 100% bei

der Kontrollgruppe. Erstaunlicherweise zeigten die mit dem Histamin-2-Rezeptorantagonisten behandelten Mäuse ebenfalls signifikant geringere Insulitisgrade, obwohl sie eine ähnlich hohe Diabetesinzidenz (77,8%) wie die unbehandelten Kontrolltiere hatten. Allerdings ergab die Analyse der Infiltrationsgrade der Einzeltiere einen dominanten Anteil an Inseln mit einem Insulitisgrad von 1 (ausschließlich Periinsulitis) bei den mit dem Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten behandelten Mäusen im Vergleich zu den mit dem Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe (66,7%; 33,3%, 12,5%). Dies unterstreicht den protektiven Effekt der Histamin-1-Rezeptorblockade auf den Erhalt der β -Zellen.

Die Analyse der Diabetesinzidenz in Relation zur Insulitis bekräftigen den beschriebenen β -Zell- und Diabetes-Schutz durch Histamin-Rezeptor-Blockade: Die Mäuse, die den Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten erhielten und einen Insulitisgrad von 1 hatten, zeigten eine signifikant geringere Diabetesmanifestation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (33,3% vs 100%). Hingegen zeigten die Mäuse mit einem Insulitisgrad von 1, welche mit dem Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten behandelt wurden, eine ähnlich hohe Diabetesinzidenz wie die unbehandelten Kontrolltiere (80% vs 100%). Zudem konnte eine spätere Diabetesentwicklung bei den Mäusen mit dem Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten und einer geringen lymphozytären Infiltration der Inseln im Vergleich zu den Tieren mit dem Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten und der Kontrollgruppe festgestellt werden (24 vs 14 vs 22 Wochen).

Schlussfolgernd bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vorbefunde von Jutel hinsichtlich der Verstärkung von Th2-Immunität nach Blockierung von Histamin-1-Rezeptoren. Über eine Veränderung der Immunantwort zum protektiven Th2-Phänotyp kann die Inselentzündung inhibiert und die Diabetesinzidenz reduziert werden. Allerdings sind die Ergebnisse dieser Arbeit kontrovers zu den Vorergebnissen eines Interventionsversuches mit dem Histamin-1-Rezeptorantagonisten Ketotifen am Menschen. Hierbei wurde Ketotifen neun prädiabetischen Personen im Erwachsenenalter über drei Monate verabreicht. Ein protektiver Effekt des Histamin-1-Rezeptorblockers auf die Diabetesmanifestation konnte nicht beobachtet werden (14).

Möglicherweise ist dieses gegensätzliche Ergebnis zum einen aufgrund des späten Beginns der Studie zu einem schon fortgeschrittenen Stadium der Diabetesentwicklung und zum anderen aufgrund der zu kleinen Versuchsgruppe erklärbar. Allerdings könnte die Wirkung des Histamin-1-Rezeptorblockers im NOD Mausmodell von der Wirkung beim Menschen abweichen. Daher sind weitere Untersuchungen über den Einfluss von Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten auf die Entstehung von Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes und den zugrunde liegenden Wirkmechanismus vor allem beim Menschen sinnvoll.

7.4. Einfluss einer Immunintervention durch exogenes Insulin auf die Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell

Bereits seit Jahren versucht man im Tiermodell der NOD Maus durch antigenspezifische Therapien die Diabetesmanifestation zu verzögern oder gar zu verhindern. Verschiedene Studien berichten erfolgreich über Therapien mit dem diabetesassoziierten Autoantigen Insulin (6,23,27,104,120). Insulin ist das einzige β -Zell spezifische Antigen, gegen das spezifische Insulinautoantikörper gebildet werden. Zur klinischen Manifestation des Typ 1 Diabetes kommt es nur, wenn der Großteil der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zerstört sind. So sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob durch eine Immunintervention mit Insulin eine Verringerung der Insulitisausprägung bei der NOD Maus erreicht werden kann, und folglich die Krankheitsentstehung des Autoimmundiabetes verzögert oder verhindert werden kann.

Dazu wurden weibliche NOD Mäuse untersucht und in fünf Gruppen aufgeteilt. Einer Gruppe wurde intramuskulär Insulin verabreicht. Die anderen Gruppen erhielten die Antigene Glutamatdecarboxylase (GAD) und Protein-Tyrosinphosphatase IA-2 β (IA-2 β) bzw. die Kontrollantigene Glucagon und Phenoethanolamin-N-Methyl-Transferase (PNMT) und wurden als eine Kontrollgruppe zusammen analysiert. Unter der Immunintervention mit dem diabetesassoziierten Antigen Insulin konnte eine, wenn auch nicht signifikante Verringerung der Insulitisausprägung erzielt werden. Bei 50% der mit Insulin immunisierten NOD Mäuse konnte ein Insulitisgrad von 0 (keine lymphozytäre Infiltration der Langerhans'schen Inseln) bzw. 1 (periinsuläre Infiltration) analysiert werden. Dagegen zeigten nur 26,3% der Tiere aus der Kontrollgruppe eine solch geringgradige Insulitis. Zudem konnte das

Diabetesrisiko bei den NOD Mäusen, welche Insulin verabreicht bekamen, wenn auch wiederum nicht signifikant, im Vergleich zur Kontrollgruppe gesenkt werden (25% versus 63%). Dass die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zeigten, ist aufgrund der zu geringen Anzahl der Versuchstiere (4 versus 19) zu erklären. Dennoch belegen die Ergebnisse dieser Arbeit beschriebene Vorbefunde. So konnte Atkinson durch die subkutane Verabreichung von Schweineinsulin prädiabetischer NOD Mäuse eine Reduktion der Diabetesinzidenz von 65% auf 8% erreichen (6). Ebenso führte die Immunisierung mit Insulin zu einer Verringerung der Insulitisausprägung. Atkinson beschreibt zudem einen protektiven Effekt des Insulins auf den Erhalt der Langerhans'schen Inseln. Unter einer Insulintherapie scheinen die Inseln in ihrer Morphologie weniger geschädigt zu sein. Auch Shah konnte ähnliche Befunde beim Menschen erheben. Eine Ruhigstellung der β -Zelle durch eine unterstützende maximale Insulintherapie nach Manifestation des Typ 1 Diabetes scheint den Immunprozess zu verlangsamen und die C-Peptid-Sekretion für ein Jahr zu erhalten (104). Eine große Interventionsstudie, die DPT-1 Studie (Diabetes prevention trial-1 Study), welche die Wirksamkeit von subkutanem Insulin bzw. die orale oder intranasale Verabreichung von Insulin auf die Diabetesentwicklung getestet hat, konnte zeigen, dass unter einer parenteralen Insulintherapie das Diabetesrisiko bei Personen mit einem Hochrisikogenotyp nicht gesenkt werden konnte. Orales Insulin dagegen kann die Manifestation des Typ 1 Diabetes verzögern, sogar dann wenn der Immunprozess bereits in Gang gesetzt wurde (29,105). Der wirkungsvollere Effekt der oralen Insulinverabreichung auf die Diabetesentwicklung ist vermutlich darin begründet, dass über das darmassoziierte Immunsystem eine Art Toleranz induziert werden kann und das Immunsystem beruhigt. Aufbauend auf diese Ergebnisse wird derzeit eine Primärinterventionsstudie, die Pre-Point Studie durchgeführt, welche zum Ziel hat, durch die Behandlung mit oralem bzw. nasalem Insulin die Bildung von diabetesassoziierten Antikörpern bei Kindern mit einem Hochrisikogenotyp, die selbst aber noch keine diabetesspezifischen Antikörper gebildet haben, zu verhindern. Mit der Pre-Point Studie soll die geeignete Dosis und die Art der Verabreichung des Insulins bestimmt werden. In einer weiterführenden Studie, der Point Studie, wird dann der schützende Effekt dieser Insulinbehandlung auf die Diabetesentwicklung untersucht.

Ebenso wie subkutane Insulininjektionen führten wöchentliche orale Verabreichungen von Insulin bei den von Zhang et al. untersuchten NOD Tieren zu einer Reduktion der Diabetesinzidenz und verzögerten Diabetsmanifestation (120). Intramuskuläre Injektionen von Plasmid-DNA, die die Insulin- β -Kette kodiert, mit Inkompletten Freund'schen Adjuvants (IFA) in transgene Mäuse reduzieren die Diabetesinzidenz ebenfalls (23). Ähnliche positive Effekte erbrachten Injektionen von Insulin in Kombination mit IFA, einem Peptid der Insulin – β -Kette mit IFA, dem Peptid alleine und dessen intranasale Verabreichung (27,79).

Im Vergleich dazu zeigten neueste Untersuchungen aus China kein Aufhalten der Insulitis bei NOD Mäusen durch die subkutane Verabreichung von exogenem Insulin, wohl aber eine Reduktion der Diabetesmanifestation. Auffällig waren aber höhere Titer des Th2 spezifischen Zytokins IL-4 und niedrigere Titer des Th1 spezifischen Zytokins INF- γ im Serum der mit Insulin immunisierten NOD Mäuse (54). Diese Ergebnisse entsprechen den Vorbefunden von Muir. Auch er konnte keine Verringerung der Insulitis bei NOD Mäusen, welche subkutan Insulin verabreicht bekamen, feststellen. Es fielen aber ebenfalls geringere Konzentrationen des Th1 spezifischen Interleukins INF- γ innerhalb der pankreatischen Inseln im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf. Die bei der Immunisierung verabreichten Stoffe scheinen regulatorische T-zellen zu stimulieren und über deren Ausschüttung von Zytokinen eine Verschiebung von einer Th1 gewichteten hin zu einer Th2 dominierten Immunantwort zu induzieren mit der Folge der Zerstörung der β -Zellen und damit Typ 1 Diabetes zu verhindern. Es ist bekannt dass das frühe Stadium der Insulitis Th2-dominiert und aus diesem Grund nicht destruktiv ist, und vor bzw. bei Diabetesmanifestation eine Veränderung des Zytokinprofils von CD4+ Zellen in Richtung Th1-Immunantwort stattfindet, was zur Zerstörung der β -Zellen führt. Somit könnte eine Therapie mit exogenem Insulin auf den Erhalt der β -Zelle sehr viel versprechend sein.

Da die Ergebnisse der zugrunde liegenden Arbeit auf einer zu geringen Fallzahl basieren, wären, um genauere Aussagen über den Effekt von exogenem Insulin auf die Entwicklung von Inselautoimmunität und Autoimmundiabetes zu schlussfolgern, weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv am NOD Mausmodell sinnvoll.

8. Zusammenfassung

Die pankreatischen Inseln eines Typ 1 Diabetikers zeigen eine chronische Entzündung und eine Infiltration mit T-Lymphozyten und Makrophagen. Diese Insulitis ist ein typisches Merkmal des Autoimmundiabetes. Der auslösende Faktor, der zur Insulitis und Aktivierung des körpereigenen Immunsystems gegenüber den insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas führt, ist bisher noch nicht eindeutig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb, durch verschiedene Therapieansätze den Insulitisprozess im NOD (nonobese diabetic) Mausmodell zu inhibieren und folglich die Entwicklung des autoimmunen Diabetes zu verhindern.

Zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Therapieansätzen zählen nutritive (Einfluss von Gluten in der Nahrung), pharmakologische (Histamin-Rezeptor-Antagonisten) und immunmodulatorische (Insulinimmunisierungen) Interventionen.

Im NOD Mausmodell wurde bereits über einen Zusammenhang zwischen einer glutenfreien Nahrung und einer verringerten Diabetesinzidenz berichtet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob Gluten auch einen Einfluss auf die Insulitisentwicklung hat und ob diese mit einer veränderten Diabetesmanifestation einhergeht. In einem weiteren pharmakologischen Ansatz sollte geprüft werden ob durch die Behandlung mit Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten die Diabetesinzidenz und die Insulitisentwicklung reduzierte werden kann. Es wurde beschrieben, dass durch die Bindung von Histamin an Histamin-1-Rezeptoren andere Zytokinantworten resultieren als durch die Bindung an Histamin-2-Rezeptoren. Diesbezüglich wurden NOD Mäuse oral mit einem Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten bzw. Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten über das Trinkwasser behandelt, wobei die Verabreichung des Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten zu einer Verschiebung der Immunantwort weg von dem destruktiven Th1- hin zum protektiven Th2-Phänotyp führen sollte. Dies sollte mit einer Verringerung der Insulitisausprägung einhergehen. Eine weitere Möglichkeit der Intervention stellt eine Immunisierung mit dem diabetesassoziierten Antigen Insulin dar. Es wurde publiziert, dass durch Immunisierungen mit dem diabetesassoziierten Antigen Insulin die Entstehung von Autoimmundiabetes im NOD Mausmodell verhindert werden kann. In einem letzten Therapieansatz wurden NOD Mäuse mit Insulin und als Kontrolle mit Glutamatdecarboxylase (GAD), Protein-Thyrosinphosphatase IA-2 β (IA-2 β), Glucagon und Phenolethanolamin-N-

Methyltransferase (PNMT) immunisiert, um zu untersuchen, ob dadurch die Insulitis in ihrer Ausprägung reduziert werden kann.

Diese Arbeit sollte die Grundlage für neue Ansätze in der Prävention des Typ 1 Diabetes beim Menschen bilden.

Folgende Ergebnisse konnten erhoben werden:

Von den drei durchgeführten Studien zeigten zwei Therapieansätze signifikante protektive Auswirkungen auf die Insulitisentwicklung und Diabetesmanifestation.

- 1.) Eine glutenfreie Ernährung der NOD Mäuse führte im Vergleich zur glutenhaltigen Standard-Ernährung der Tiere zu einer signifikanten Verringerung der Insulitisausprägung. 54,3% der glutenfrei ernährten NOD Mäuse zeigten eine geringgradige Infiltration der Inseln im Vergleich zu 22,7% der Tiere aus der Kontrollgruppe. 45,7% der glutenfrei ernährten NOD Mäuse zeigten eine mäßige bis massive Infiltration der Langerhans'schen Inseln im Vergleich zu 77,3% der Kontrollgruppe. Zudem konnte durch die glutenfreie Ernährung der Tiere eine hoch signifikante Verringerung der Diabetesinzidenz erzielt werden. Nur 43,5% der glutenfrei ernährten NOD Mäuse entwickelten Diabetes. Dagegen betrug die Diabeteshäufigkeit in der Kontrollgruppe 81,8%. Ferner konnte durch eine glutenfreie Ernährung der Tiere das kumulative Diabetesrisiko in Abhängigkeit zum Infiltrationsgrad der Langerhansinseln signifikant verringert werden. Dieses betrug bei den glutenfrei ernährten Tieren mit einem Insulitisgrad von 0 und 1 40% im Vergleich zu 80% der Kontrollgruppe. Das kumulative Diabetes-Risiko der glutenfrei ernährten Tiere mit einem Insulitisgrad von 2 und 3 betrug 47,6%, im Vergleich zu 82,4% der Kontrollgruppe.

Die Analyse der Insulitisentwicklung und Diabetesmanifestation unter dem Einfluss von Gluten bei NOD Mäusen gleichen Alters (12 Wochen) ergab weder für die Diabetesmanifestation noch für die Insulitisentwicklung einen signifikanten Unterschied. Dies ist am ehesten aufgrund der zu geringen Fallzahl (n=14) zu erklären. Denn es zeigte sich unter einer glutenfreien Ernährung der Tiere ebenfalls eine deutliche Reduktion der Insulitisausprägung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies bestätigt die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Studie. Ferner konnten bei den glutenfrei ernährten NOD Mäusen deutlich mehr Inseln ausgewertet werden als bei den mit der glutenhaltigen Standardnahrung ernährten Tieren. Dies deutet darauf

hin, dass unter der glutenfreien Nahrung die Langerhans'schen Inseln des Pankreas länger ungeschädigt bleiben.

- 2.) Die Verabreichung eines Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten führte zu einer signifikant geringeren Ausprägung der Insulitis und signifikanten Reduktion der Diabetesinzidenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (55,6% vs 100%). Erstaunlicherweise zeigten die mit dem Histamin-2-Rezeptorantagonisten behandelten NOD Mäuse ebenfalls signifikant geringere Insulitisgrade, obwohl sie eine ähnlich hohe Diabetesinzidenz wie die unbehandelten Kontrolltiere hatten (77,8% vs 100%). Die Analyse der Infiltrationsgrade der Einzeltiere ergab einen dominanten Anteil an Inseln mit ausschließlich periinsulären Infiltraten bei den mit dem Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten behandelten NOD Mäusen im Vergleich zu den mit dem Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe (66,7%; 33,3%, 12,5%). Dies unterstreicht den protektiven Effekt der Histamin-1-Rezeptorblockade auf den Erhalt der β -Zellen. Zudem konnte das kumulative Diabetesrisiko in Abhängigkeit zum Infiltrationsgrad der Inseln durch die Verabreichung des Histamin-1-Rezeptor-Antagonisten signifikant reduziert werden. NOD Mäuse mit einer gering gradigen Insulitis entwickelten nur in 33,3 % der Fälle Diabetes im Vergleich zu 100 % der unbehandelten Tiere mit einer gering gradigen Insulitis. Hingegen zeigten die mit dem Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten behandelten NOD Mäuse mit einer gering gradigen Insulitis ähnlich hohe Diabetes-Inzidenzen wie die unbehandelten Kontrolltiere (80% vs 100%).
- 3.) Die Immunisierung mit dem diabetesassoziierten Antigen Insulin führte zu keiner signifikanten Reduzierung der Insulitisentwicklung und der Diabetesmanifestation. Dennoch ist von einer protektiven Wirkung des Insulins auf die Insulitisentwicklung auszugehen, da bei 50 % der mit Insulin behandelten NOD Mäuse keine Infiltration der Inseln bzw. lediglich periinsuläre Infiltrate analysiert werden konnten. Eine solch geringgradige Insulitis ergab sich nur in 26,3% bei der Kontrollgruppe ($p = 0,116$). Ferner konnte das Diabetesrisiko unter einer Insulintherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe gesenkt werden (25% versus 63%; $p = 0,28$).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit sind verschiedene Therapieansätze für zukünftige Anwendungen beim Menschen denkbar.

Die Möglichkeit eine Prävention des Typ 1 Diabetes durch eine glutenfreie Ernährung wird bereits bei Kindern mit einem hohen Diabetes-Risiko innerhalb der BabyDiät – Studie geprüft. Aus vorausgegangenen Studien weiß man, dass sich bei Kindern das Diabetesrisiko erhöht, wenn diese vor dem 4. Lebensmonat getreidehaltige Nahrungsmitten angeboten bekamen. Besonders deutlich zeigte sich der Risikoanstieg bei genetisch belasteten Kindern. Ernährung und Darmreife scheinen demnach eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Typ 1 Diabetes zu spielen. Deshalb wird in der BabyDiät – Studie versucht durch eine spätere Zufütterung der Kinder mit getreidehaltiger Kost den Autoimmunprozess der zur Manifestation des Typ 1 Diabetes führt zu verzögern oder gar zu verhindern. Der genaue Wirkungsmechanismus des Gluten auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes bedarf jedoch weiterer Forschung, da neueste Berichte sogar von einer protektiven Wirkung einer im Glutengehalt erhöhten Nahrung auf die Entwicklung des Typ 1 Diabetes ausgehen.

Ferner sollte innerhalb einer prospektiven doppelblinden Studie die protektive Wirkung von Histmin-1-Rezeptor-Blockierungen auf die Entwicklung des Typ 1 Diabetes untersucht werden. Histamin-Rezeptor-Antagonisten sind seit Jahren geprüfte und in der Medizin eingesetzte Medikamente und finden vor allem in der Allergologie und Hemmung der Magensäureproduktion ihre Anwendung. Dieser Therapieansatz ist sehr viel versprechend und eine Anwendung beim Menschen scheint gerechtfertigt zu sein.

Seit Jahren wird die Wirkung des Hormons Insulin auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes sowohl am Tiermodell der NOD Maus als auch beim Menschen geprüft. Derzeit wird in den USA eine Studie durchgeführt, die bei Hochrisikopatienten den Effekt von oralem Insulin auf die Entwicklung von Autoimmundiabetes in einem sehr frühen Erkrankungsstadium untersucht. In der aktuell durchgeführten internationalen Primärventionsstudie, der Pre-Point Studie, wird dagegen durch die Behandlung von Kindern, welche ein sehr hohes Diabetesrisiko haben, mit oralem bzw. nasalem Insulin versucht, die Entwicklung von diabetesassoziierten Antikörpern bereits im Vorfeld eines Autoimmundiabetes zu

verhindern. Mit der Pre-Point Studie soll die am besten geeignete Dosis und Darreichungsform des Insulins bestimmt werden. In der weiterführenden POINT Studie, wird dann über einen längeren Zeitraum der schützende Effekt dieser Insulinbehandlung auf die Entwicklung des Autoimmundiabetes untersucht. Durch die Verabreichung von Insulin über den Verdauungstrakt soll eine Art Toleranz induziert und das Immunsystem beruhigt werden. Sollte dadurch tatsächlich ein präventiver Effekt auf die Krankheitsentstehung erreicht werden, wäre eine einfache und elegante Therapieform gefunden, für die ein hohes Maß an Akzeptanz zu erwarten wäre.

Literaturverzeichnis

1. Expert committee on diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-97, 1997.
2. Abiru N, Yu L, Miao D, Maniatis AK, Liu E, Moriyama H, Eisenbarth GS. Transient insulin antibody expression independent of development of diabetes: comparison of NOD and NOR strain. *J Autoimmun* 17(1): 1-6, 2001.
3. Atkinson MA, Eisenbarth G. Typ 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet* 358: 221-9, 1 A.D.
4. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 331: 1428-36, 1994.
5. Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R. Autoantibodies in noneobese diabetic mice immunoprecipitate 64,000-Mr islet antigen. *Diabetes* 37: 1587-90, 1988.
6. Atkinson MA, Maclaren NK, Luchetta R. Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes* 39: 933-7, 1990.
7. Bach J-F. Insulin-Dependent Diabetes Mellitus as an Autoimmune Disease. *Endocrine Reviews* 15: 516-42, 1994.
8. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, DeCamilli P. Identification of the 64k autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347: 151-6, 1990.
9. Banu Y, Watanabe T. Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1 receptor signaling. *J Exp Med* 189(4): 673-82, 1999.
10. Barnett A, Eff C, Leslie R, Pyke D. Diabetes in identical twins: a study of 200 pairs. *Diabetologia* 20: 404-9, 1981.
11. Beer DJ, Rocklin RE. Histamine modulation of lymphocyte biology: membrane receptors, signal transduction, and functions. *Crit Rev Immunol* 7(1): 55-91, 1987.
12. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJ, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1701-10, 1997.
13. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte M-T, Bottazzo GF, Gale EA. Combined Analysis of Autoantibodies improves prediction of IDDM in islet dell antibody-positive relatives. *Diabetes* 43: 1304-10, 1994.
14. Bohmer KP, Kolb H, Kuglin B, Zielasek J, Hubinger A, Lampeter EF, Weber B, Kolb-Bachofen V, Jastram HU, Bertrams J, et al. Linear loss of insulin secretory capacity during the last six month preceding IDDM.No effect of antiedematous therapy with ketotifen. *Diabetes Care* 17(2): 138-41, 1994.

15. Bonifacio E, Atkinson MA, Eisenbarth GS, Serreze D, Kay TWH, Lee-Chan E, Singh B. International Workshops on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of human autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 50: 2451-8, 2001.
16. Bonifacio E, Bingley PJ, Shattock M, Dean BM, Dunger D, Gale EA, Bottazzo GF. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335: 147-9, 1990.
17. Bonifacio E, Ziegler A.G., Hummel M, Dittler J, Lampasona V, Pastore MR, Bosi E. Gluten: is it also a determinant of islet autoimmunity? *Diabetes Metab Rev* 24: 259-60, 1998.
18. Borch-Johnson K, Mandrup-Poulsen T, Zachau-Christiansen Bea. Relation between breast feeding and incidence rate of insulin-dependent diabetes mellitus: a hypothesis. *Lancet* ii 1086, 1984.
19. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PGF, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *New England Journal of Medicine* 313: 353-60, 1985.
20. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2: 1379-83, 1974.
21. Bruining GJ, Molenaar JL, Grobbee DE, Hofman A, Scheffer GJ, Bruining HA, de Bruyn AM, Valkenburg HA. Ten year follow-up study of islet cell antibodies and childhood diabetes mellitus. *Lancet* 1: 1100-3, 1989.
22. Christie MR, Genovese S, Cassidy D, Bosi E, Brown TJ, Lai M, Bonifacio E, Bottazzo GF. Antibodies to islet 37K antigen, but not to glutamate decarboxylase, discriminate rapid progression to IDDM in endocrine autoimmunity. *Diabetes* 43: 1254-9, 1994.
23. Coon B, An LL, Whitton JL, von Herrath MG. DNA immunization to prevent autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 104: 189-94, 1999.
24. Couper JJ, Steele C, Beresford S, et al. Lack of association between duration of breast feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes* 48: 2149, 1999.
25. Cronin CC, Shanahan F. Insulin-dependent diabetes mellitus and coeliac disease. *Lancet* 349: 1096-7, 1997.
26. Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G. Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. *Diabetes Care* 22: 1698-072, 1999.
27. Daniel D, Wegmann DR. Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 956-60, 1996.

28. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SCL, Palmer, S.M., Balfour KM, Rowe B, Farall M, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 371: 130-6, 1994.
29. Diabetes prevention trial-type 1 Diabetes study group. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *The new England Journal of Medicine* 346: 1685-1691b, 2002.
30. Eisenbarth GS, M D, Ph D. Type 1 Diabetes mellitus a chronic autoimmune disease. *The new England Journal of Medicine* 31: 1360-8, 1986.
31. Elliot RB, Martin JM. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 26: 297-9, 1984.
32. Elliot RB, Reddy SN, Bibby NJ, Kida K. Dietary prevention of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 31: 62-4, 1988.
33. Flohé SB, Wasmuth HE, Kerad JB, Beales PE, Pozzilli P, Elliot RB, Hill JP, Scott FW, Kolb H. A wheat-based, diabetes-promoting diet induces a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine* 21: 149-54, 2003.
34. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MM, Richmond JA, Weir RS. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 29: 267-74, 1986.
35. Föchtenbusch M, Ziegler AG. Umweltfaktoren in der Pathogenese des Typ-1-Diabetes. *Diab Stoffw* 4: 1-9, 1995.
36. Fujita K, Yui R, Kusumoto Y, Serizawa Y, Makino S, Tochino Y. Lymphocyte insulinitis in a non-obese diabetic (NOD) strain of mice and immunohistochemical and electron microscopic investigation. *Biochem Biophys Res Commun* 3: 429-43, 1982.
37. Funda DP, Kaas A, Bock T, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K. Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 323-7, 1999.
38. Funda DP, Kaas A, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K. Gluten-free but also gluten-enriched (gluten+) diet prevent diabetes in NOD mice; the gluten enigma in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2007.
39. Gantz I, DelValle J, Wang LD, Tashiro T, Munzert G, Guo YJ, Konda Y, Yamada T. Molecular basis for the interaction of histamine with the histamine H2 receptor. *J Biol Chem* 267(29): 20840-3, 1992.
40. Gepts W, Lecompte PM. The pancreatic islets in diabetes. *American Journal of Medicine* 70: 105-15, 1981.
41. Gill DS, Barradas MA, Fonseca VA, Dandonna P. Plasma histamine concentrations are elevated in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease. *Metabolism* 38(9): 243-7, 1989.

42. Graves PM, Barriga KJ, Norris JM, et al. Lack of association between early childhood immunizations and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Care* 22: 1694-7, 1999.
43. Hänninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 90: 1901-10, 1992.
44. Hansen AK, Fengjun L, Kaas A, Funda DP, Farlow H, Buschard K. Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of intestinal Gram positive bacteria in NOD mice. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 220-5, 2006.
45. Haskins K, McDuffie M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet specific T cell clone. *Science* 249: 1433-6, 1990.
46. Haskins K, Wegmann D. Diabetogenic T-cell clones. *Diabetes* 45(10): 1299-305, 1996.
47. Hoorfar J, Buschard K, Dagnes-Hansen F. Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Nutr* 69: 597-607, 1993.
48. Hummel M, Bonifacio E, Naserke HE, Ziegler A.G. Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects. *Diabetes Care* 25: 1111-6, 2002.
49. Hummel M, Durinovic-Bello I, Ziegler A.G. Relation between cellular and humoral immunity to islet cell antigens in type 1 diabetes. *J Autoimmun* 9(3): 427-30, 1996.
50. Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler A.G. No major association of breast feeding, vaccination and common childhood viral disease with early islet autoimmunity in the German BABY-DIAB study. *Diabetes Care* 23: 969-74, 2000.
51. Hyöty H, Hiltunen M, Reunanen A, et al. The childhood in Finland study group: Decline of mumps antibodies in type 1 (Insulin-dependent) diabetic children and a plateau in the rising incidence of type 1 diabetes after introduction of the mumps-measles-rubella vaccine in Finland. *Diabetologia* 36: 1303-8, 1993.
52. Jaeckel E, Klein L, Martin-Orozco N, von Boehmer H. Normal incidence of diabetes in NOD mice tolerant to glutamic acid decarboxylase. *J Exp Med* 197(12): 1635-44, 2003.
53. Janeway CA, Trevers P. *Immunologie*. Vol. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1997.
54. Jiang TJ, Zhou ZG, Su H. Inhibition of islet beta cell apoptosis and prevention diabetes by subcutaneous administration of insulin in NOD mice. *Medical science Journal of central South University* 31(4): 499-504, 2006.

55. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OAR, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by different expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413: 420-5, 2001.
56. Kallmann B, Hüther M, Tubes M, et al. Systemic bias of cytokine production toward cell-mediated immune regulation in IDDM and toward humoral immunity in Graves disease. *Diabetes* 46: 237, 1997.
57. Karlsson Mg, Ludvigson J. Peptide from glutamic acid decarboxylase similar to coxsackie B virus stimulates INF- γ mRNA expression in TH 1-like lymphocytes from children with recent-onset insulin dependent diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 35: 137-44, 1998.
58. Kobe J. Tolerance mechanisms in murine autoimmune diabetes induced by Anti-ICAM-1/LFA-1 mAb and Anti-CD8 mAb. *Medical science* 48: 167-75, 2002.
59. Koczwara K, Schenker M, Schmid S, Kredel K, Ziegler A.G., Bonifacio E. Charakterisation of antibody response to exogenous and endogenous antigen in the nonobese diabetic mouse. *Clinical Immunology* 106: 155-62, 2003.
60. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev* 3: 751-78, 1987.
61. Kolb H. Benign versus destruktiv insulitis. *Diabetes Metab Rev* 13: 139-46, 1997.
62. Kolb H. Diabetes. In: p. 540-547, 2005.
63. Kulmala P, Savola K, Petersen JS, Vahasalo P, Karjalainen J, Loppinen T, Dyrberg T, Akerblom HK, Knip M. Prediction of insulin dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes. A population based study. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Invest* 101(2): 327-36, 1998.
64. Lampasona V, Bonfanti R, Bazzigaluppi E, Venerando A, Chiumello G, Bosi E, Bonifacio E. Antibodies to tissue transglutaminase C in type 1 diabetes. *Diabetologia* 42: 1195-8, 1999.
65. Lan MS, Lu J, Goto Y, Notkins AL. Molecular cloning and identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, IA-2, from human insulinoma. *DNA Cell Biol* 13: 505-14, 1994.
66. Leiter EH. The NOD Mouse: A Model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease. *ILAR News* 35: 4-14, 1993.
67. Leonhardt H. Endokrine Organe. In: *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen - Band 3*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, p. 390-391, 1990.

68. Leonhardt H. Verdauungsorgane. In: Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen - Band 3. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, p. 449-451, 1990.
69. Leurs R, Smit MJ, Timmermann H. Molecular pharmacological aspects of Histamin receptors. *Pharmacol Ther* 66(3): 413-63, 1995.
70. Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol* 55(6): 1101-7, 1999.
71. Maclaren NK, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir, A., Clare-Salzer M, She JX, Malone J, Crockett S, Schwartz S, Quattrin T, DeSilva M, Vander Vegt P, Notkins AL, Krischer, J. Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmun* 12(4): 279-87, 1999.
72. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp Anim* 29: 1-13, 1980.
73. Maurano F, Mazzarella, G., Luongo D, Stefanile R, D'Arienzo R, Rossi M, Auricchio D, Troncone R. Small intestinal enteropathy in non-obese diabetic mice fed a diet containing wheat. *Diabetologia* 48: 931-7, 2005.
74. Mehnert H, Standl E, Usadel K-H, Höring H-U. Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese des Typ- 1- Diabetes. In: *Diabetologie in Klinik und Praxis*. p. 53-67, 2005.
75. Mehnert H, Standl E, Usadel K-H, Höring H-U. Klassifikation und Genetik. In: *Diabetologie in Klinik und Praxis*. Thieme Verlag, p. 43-52, 2005.
76. Morgenthaler NG, Seißler J, Achenbach P, Glawe D, Payton M, Meinck HM, Christie MR, Scherbaum WA. Antibodies to the tyrosine phosphatase-like protein IA-2 are highly associated with IDDM, but not with autoimmune endocrine diseases or stiffmann syndrome. *Autoimmunity* 25: 203-11, 1997.
77. Mosman TR, Cherwinski HM, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-57, 1986.
78. Mosman TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-46, 1996.
79. Muir A, Peck A, Clare-Salzler M, Song YH, Cornelius J, Luchetta R, Krischer J, Maclaren NK. Insulin immunisation of nonobese diabetic mice induces a protective insulitis characterized by diminished intraislet interferon- γ transcription. *J Clin Invest* 95: 628-83, 1995.
80. Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun* 279(2): 615-20, 2000.

81. Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, et al. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes autoimmunity study in the young. JAMA 276: 609-14, 1996.
82. Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. J Biol Chem 277: 43545-8, 2002.
83. Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RD. The significance of the concordance rate for type-1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. Diabetologia 31: 747-50, 1988.
84. O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker E, Simson T, Lund D, Kiossis F, Takei Jeal. Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD-mice: a fact of cell transfer and transgen expression. Eur J immunol 21: 1171-80, 1991.
85. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyne K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin autoantibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. Science 222: 1337-9, 1983.
86. Pan L, Achenbach P, Barker J, Bingley PJ, Chiumello G, Eisenbarth GS, Hasford J, Rabl W, Roth R, Schober E, Schönle E, Bonifacio E, Ziegler A.G. Primäre Immunintervention mit oralem/nasalem Insulin zur Prävention des Typ 1 Diabetes bei Kindern mit einem sehr hohen genetischen Risiko - Die Pre-Point (Primary Oral/intranasal INsulin Trial) Studie. 42 Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, 16 -19 Mai 2007 in Hamburg, Diabetologie und Stoffwechsel 2: P389, 2007.
87. Pastore MR, Bazzigaluppi E, Belloni C, Arcovio C, Bonifacio E, Bosi E. Six month of gluten-free diet do not influence autoantibody titers, but improve insulin secretion in subjects at high risk for type 1 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 88: 162-5, 2003.
88. Pedotti R, DeVoss JJ, Youssef S, Mitchell D, Wedemeyer J, Madanat R, Garren, H., Fontoura P, Tsai M, Galli SJ, Sobel RA, Steinmann L. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. Proc Natl Acad Sci USA 100: 1867-72, 2003.
89. Pocecco M, Ventura A. Coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus: a casual association? Acta Paediatr 84(12): 1432-3, 1995.
90. Pozzili P, on behalf of the IMDIAB Group. BCG vaccine in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet 349: 1520-1, 1997.
91. Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PMM. Islet antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. J Immunol 152: 3183-8, 1994.
92. Reddy SN, Bibby NJ, Elliot RB. Ontogeny of islet cell antibodies, insulin autoantibodies and insulinitis in the non-obese diabetic mouse. Diabetologia 105: 322-8, 1988.

93. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, Spillar RP, Siverstein JH, Schatz DA, Schwartz S, Malone J, Shah S, Vadheim C, Rotter JI. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *New England Journal of Medicine* 323: 1167-72, 1990.
94. Roll, U., Christie MR, Füchtenbusch M, Ziegler A.G. Antibodies to GAD are not the first to appear in life in offspring of diabetic mothers or fathers, but are of value for the prediction of type 1 diabetes. *Diabetes* 44(suppl):77A: 1995.
95. Ross Fidl M. Study tests oral insulin to prevent type 1 diabetes. University of Florida / [http:// webapps health vfl edv](http://webapps.health.vfl.edv) 2007.
96. Roszkowski W, Plaut M, Lichtenstein LM. Selective display of histamine receptors on lymphocytes. *Science* 195(4279): 683-5, 1977.
97. Schmid S, Koczwara K, Schwinghammer S, Lampasona V, Ziegler AG, Bonifacio E. Delayed exposure to wheat and barley proteins reduces diabetes incidence in non-obese diabetic mice. *Clinical Immunology* 111: 108-18, 2004.
98. Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 23(5): 255-63, 2003.
99. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 119(1) 242, 2000.
100. Scott FW. Food-induced Typ 1 Diabetes in the BB rats. *Diabetes Metab Res Rev* 12: 341-59, 1996.
101. Scott FW, Cloutier HE, Kleemann R, Woerz-Pagenstert U, Rowsell P, Modler HW, Kolb H. Potential mechanisms by which certain foods promote or inhibit the development of spontaneous diabetes in BB rats: dose, timing, early effect on islet area, and switch in infiltrate from Th1 to Th2 cells. *Diabetes* 46(4): 589-98, 1997.
102. Seißler J, Amann, J., Mauch L, Haubruck H, Wolfahrt S, Bieg S, Richter W, Holl R, Heinze E, Northemann W, Scherbaum WA. Prevalence of autoantibodies to the Mr 65,000 and Mr 67,000 isoforms of glutamate decarboxylase (GAD) in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92: 1394-9, 1993.
103. Seißler J, Bieg S, Yassin N, Mauch L, Northemann W, Boehm BO, Scherbaum WA. Association between antibodies to the Mr 67,000 isoform of glutamate decarboxylase (GAD) and type 1 diabetes mellitus with coexisting autoimmune polyendocrine syndrome II. *Autoimmunity* 19: 231-8, 1994.
104. Shan SC, Malone J, Simpson NE. A randomized trial of intensive insulin therapy in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 320: 550-4, 1989.
105. Skyler JS KJWJCCPJGCCDR-MLCHLE. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. *Diabetes Care* 28 (5): 1068-76, 2005.

106. Solimena M, Dirx R, Hermel JM, Pleasic-Williams S, Shapiro JA, Caron L, Rabin DU. ICA512, an autoantigen of type 1 diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *EMBO J* 15: 2102-14, 1996.
107. Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, DeCamilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *New England Journal of Medicine* 322: 1555-60, 1990.
108. Spinas GA, Lehmann R. Der Diabetes mellitus: Diagnose, Klassifikation und Pathogenese. *Schweiz Med Forum* 20: 519-25, 2001.
109. Thivolet C, Bendelac A, Bedossa P, Bach J-F, Carnaud C. CD8+ T cell homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is CD4+ T cell-dependent. *J Immunol* 146: 85-8, 1991.
110. Tian J, Lehmann PV, Kaufman DL. Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) responses to pancreatic islet autoantigens. *J Exp Med* 186: 2039-43, 1997.
111. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85: 291-7, 1996.
112. Toyoda H, Formby B. Contribution of T-cells to the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Bioessay* 20: 750-7, 1998.
113. Vannier E, Diarello CA. Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells. Comparison with IL-1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 92(1): 281-7, 1993.
114. Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. Gastroenterology* 117: 303, 1999.
115. Ventura A, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T. Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *J Pediatr* 137: 263-5, 2000.
116. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase P, Eisenbarth GS. Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bcd/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45(7): 926-33, 1996.
117. Wasmeier C, Hutton JC. Molecular cloning of phogrin, a protein tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* 271: 18161-70, 1996.
118. Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(24): 11515-9, 1991.

119. Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: Evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (4): 1701-6, 2000.
120. Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth GS, Weir RS. Supression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10252-6, 1991.
121. Ziegler A.G., Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48: 460-81, 1999.
122. Ziegler A.G., Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290(13): 1721-8, 2003.
123. Ziegler AG. Ätiologie und Pahogenese des Typ-I-Diabetes. In: *Innere Medizin*. Thieme Verlag, p. 100-107, 1993.
124. Ziegler AG, Vardi P, Ricker A, Masakazu H, Soeldner J, Eisenbarth G. Radioassay determination of insulin autoantobodies in NOD mice. Correlation with increased risk of progression to overt diabetes. *Diabetes* 38: 358-63, 1989.

Publikation

Schmid S., Koczwara K., **Schwinghammer S.**, Lampasona V., Ziegler AG., Bonifacio E. Delayed exposure to wheat and barley proteins reduces diabetes incidence in non-obese diabetic mice. Clin immunol 111 108-118, 2004

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susanne Müller (geb. Schwinghammer)
Geburtsdatum: 2. Januar 1975
Geburtsort: München
Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schul Ausbildung

1981 – 1985 Grundschule in Haar
1985 – 1988 Ernst-Mach-Gymnasium in Haar
1988 – 1995 Edith-Stein-Gymnasium in München
Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife (Juni 1995; Note 2,4)

Hochschulstudium

1995 – 1996 Lehramt Grundschule Universität Augsburg
1996 – 1997 Lehramt Grundschule LMU München
1997 – 1999 Humanmedizin LMU München
1999 – 2003 Humanmedizin TU München
2003 – 2004 Humanmedizin LMU München

Examina

Herbst 1999: Physikum
Frühjahr 2001: 1. Staatsexamen
Frühjahr 2003: 2. Staatsexamen
Frühjahr 2004: 3. Staatsexamen (Gesamtnote 1,9)

Famulatur

Gynäkologie in der Frauenheilkunde
Dr. Geisenhofer – Klinik / München
(Oktober 1999)
Anästhesie im ambulanten Operationszentrum
AOZ – München – Nord (März 2000)
Kinderchirurgie im Krankenhaus München – Schwabing
(April 2000)
Innere Medizin im Städtischen Krankenhaus Kiel
(August 2001)

Praktisches Jahr

1. Tertial: (22.04.03 – 11.08.03)
- Kantonsspital Wolhusen (Schweiz): Chirurgie
2. Tertial: (12.08.03 – 30.11.03)
- Städt. Krankenhaus Schwabing : Innere Medizin
3. Tertial: (01.12.03 – 21.03.04)
- Klinikum Starnberg: Gynäkologie / Geburtshilfe

Beruflicher Werdegang

Assistenzärztin im Krankenhaus Rosenheim in der
I. Medizinischen Abteilung, Prof. Dr. W. Krawietz
(Kardiologie, Angiologie, Pneumologie, Allergologie,
Nephrologie, Rheumatologie) (September 2004 bis
November 2005)

Mutterschutz und Elternzeit
(November 2005 bis Oktober 2007)

Seit Oktober 2007 Assistenzärztin im Zentralklinikum
Augsburg in der Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie,
Prof. Dr. M. Beyer

Vortrag

Vorveröffentlichung von Ergebnissen der Dissertation bei
der 38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-
Gesellschaft in Bremen (28.05. – 30.05.2003)
„Delayed exposure to dietary gluten reduces diabetes
Incidence and insulinitis in NOD-mice,“

**Studienbegleitende
Tätigkeiten**

Schwesternhelferin im Städt. Krankenhaus
München-Bogenhausen (September 1995 bis März 1999)

Anästhesiehelferin im Ambulanten Operationszentrum
München Nord (März 1999 bis Februar 2004)

Pflegeassistentin im Dialysezentrum München –
Bogenhausen
(Oktober 2001-Januar 2003)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anette-G. Ziegler, die mir durch die Überlassung des Themas die Möglichkeit gab, diese Dissertation an ihrem Institut für Diabetesforschung in München zu schreiben. Ich danke ihr für ihre Anregungen, insbesondere auch für die Erfahrung der Präsentation von Studienergebnissen im Rahmen des Diabeteskongresses in Bremen.

Herrn Prof. Dr. Ezio Bonifacio danke ich sehr für seine Unterstützung bei den Ergebnisanalysen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Mitbetreuerin Frau Dr. Sandra Hummel für ihre wertvollen Anregungen und ständige Diskussionsbereitschaft sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Frau Dr. Kerstin Koczwarra für ihre tatkräftige Unterstützung, vor allem auch für die Versorgung und Präparierung der NOD Mäuse.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie und Histologie des Klinikums Schwabing, allen voran Frau Reischl, für die Einweisung in die Erstellung der Pankreasorganschnitte und die Benutzung der dafür erforderlichen Geräte.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinen Eltern, die mich durch ihre liebevolle Betreuung meines kleinen Sohnes in der Zeit der Fertigstellung uneingeschränkt unterstützt und motiviert, und somit wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich danke ich meinem Mann für seine Geduld und seine Hilfe beim Layout der Arbeit.